



La symbiose à Wolbachia (-protéobactérie) : impacts sur le système immunitaire et l'immunocompétence de son hôte *Armadillidium vulgare* (crustacé isopode)

Frédéric Chevalier

► To cite this version:

Frédéric Chevalier. La symbiose à Wolbachia (-protéobactérie) : impacts sur le système immunitaire et l'immunocompétence de son hôte *Armadillidium vulgare* (crustacé isopode). Biodiversité et Ecologie. Université de Poitiers, 2011. Français. NNT : . tel-00669717

HAL Id: tel-00669717

<https://theses.hal.science/tel-00669717>

Submitted on 14 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE POITIERS

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Poitiers

(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : **Biologie des organismes**

préparée au laboratoire **Écologie Évolution Symbiose**

dans le cadre de l'École Doctorale **Sciences pour l'environnement Gay Lussac**

présentée et soutenue publiquement par

Frédéric CHEVALIER

le 15 juin 2011

La symbiose à *Wolbachia* (α -protéobactérie) : impacts sur le système immunitaire et l'immunocompétence de son hôte *Armadillidium vulgare* (crustacé isopode)

Directeurs de thèse : **Christine BRAQUART-VARNIER**

Pierre GRÈVE

JURY

Pr. G. MITTA	Professeur des Universités	Président du jury
Dr. Y. MORET	Chargé de Recherche CNRS	Rapporteur
Dr. F. VAVRE	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
Dr. S. MOREAU	Maître de Conférences	Examineur
Dr. T. RENAULT	Cadre de Recherche IFREMER	Examineur
Pr. D. BOUCHON	Professeur des Universités	Examineur
Dr. C. BRAQUART-VARNIER	Maître de Conférences	Examineur
Pr. P. GRÈVE	Professeur des Universités	Examineur

Résumé

La symbiose constitue une force évolutive majeure permettant de nombreuses adaptations des partenaires, en particulier dans la réponse des hôtes aux agents pathogènes. Récemment, il a été mis en évidence que la bactérie *Wolbachia* modifiait les compétences immunitaires de ses hôtes. Cette α -protéobactérie endosymbiotique est présente chez de très nombreuses espèces d'arthropodes et de nématodes. Elle se transmet verticalement de la mère aux descendants *via* les ovocytes et modifie la reproduction de son hôte favorisant ainsi sa transmission dans les populations. *Wolbachia* confère également à certains insectes une résistance aux agents pathogènes humains dont ils sont les vecteurs. Chez le crustacé isopode *Armadillidium vulgare*, la présence de *Wolbachia* altère l'immunocompétence de son hôte en entraînant une diminution du taux d'hémocytes circulants (THC) et une augmentation de la septicémie naturelle. De plus, chez cette espèce, la bactérie a été observée dans l'ensemble des tissus y compris dans les tissus immunitaires (hémocytes et les organes hématopoïétiques) soulevant de nombreuses questions quant aux conséquences que cela entraîne sur le fonctionnement du système immunitaire et sur l'immunocompétence d'*A. vulgare*.

Nous avons ainsi étudié l'impact de la symbiose à *Wolbachia* sur les hémocytes, effecteurs principaux du système immunitaire, sur l'immunocompétence et sur l'expression de gènes de l'immunité d'*A. vulgare*. Nous avons montré par hybridation *in situ* fluorescente que *Wolbachia* est présente dans plus d'un tiers des hémocytes et par cytométrie en flux que la proportion d'hémocytes granulaires circulants est

plus faible chez des animaux symbiotiques âgés d'un an, sans que l'on observe de différence dans le THC à cet âge. Le dosage de l'activité phénoloxydase, réaction fondamentale de l'immunité des invertébrés, a montré que cette activité diminuait avec l'âge et le statut symbiotique des animaux. En revanche, *Wolbachia* semble protéger les hémocytes de l'apoptose et l'immunocompétence des individus symbiotiques est augmentée lors d'une infection par *Listeria ivanovii*. Enfin, la construction et l'analyse de banques d'ADNc dans le cadre du projet ANR EndoSymbArt nous a permis d'établir le premier transcriptome de référence d'un isopode et d'identifier de nouveaux gènes liés à l'immunité. La quantification de l'expression de ces gènes en présence de la bactérie a révélé une tendance à la sous-expression de ces derniers au niveau de l'animal entier et des ovaires mais une tendance à la sur-expression dans les tissus immunitaires. La construction de nouvelles banques d'ADNc d'animaux symbiotiques et asymbiotiques infectés par des bactéries pathogènes a permis d'amorcer une nouvelle approche transcriptomique par RNA-Seq.

La présence de *Wolbachia* modifie donc les caractéristiques du système immunitaire aux niveaux cellulaire et humoral, ainsi que l'immunocompétence d'*A. vulgare*. L'étude de nouveaux paramètres permettra d'établir si la présence de *Wolbachia* constitue réellement un avantage pour son hôte ou si au contraire la bactérie présente un coût parasitaire important.

Abstract

Symbiosis represents a major evolutionary force leading to many adaptations of the partners, especially in host response to pathogens. Recently, it has been shown that the endosymbiotic bacteria *Wolbachia* modified host immune competences of their hosts. These endosymbiotic α -proteobacteria are widespread among arthropods and nematodes. They are transmitted vertically from females to offspring *via* the oocytes and modify host reproduction to increase their transmission in populations. Furthermore *Wolbachia* confer resistance to human pathogens for many vector insects. In the crustacean isopod *Armadillidium vulgare*, *Wolbachia* modify the immunocompetence of their host by decreasing the total hemocyte count (THC) and increasing the natural septicemia. In this species, *Wolbachia* infect all tissues including immune tissues (hemocytes and hematopoietic organs) which raise many questions about the consequences on immune system functions and on the immunocompetence of *A. vulgare*.

We thus studied the impact of *Wolbachia* symbiosis on hemocytes, the main effectors of the immune system, on the immunocompetence and on the expression of immune genes of *A. vulgare*. We showed by fluorescent *in situ* hybridization that *Wolbachia* infect more than one third of the hemocytes and by flow cytometry that the proportion of circulating granular hemocytes is lower in one-year old infected animals, without any difference in THC at this age. The phenoloxidase activity, a fundamental reaction of invertebrate immunity, decreases with age and symbiotic status. However, *Wolbachia* presence seems to protect the hemocytes against

apoptosis and to increase host immunocompetence during infection with *Listeria ivanovii*. Finally, from the first reference transcriptome of isopods obtained by the construction and the analysis of cDNA libraries made in the frame of the ANR EndoSymbArt project, we identified new immune genes and quantified their expression in infected and uninfected animals. We observed in the presence of *Wolbachia* a trend to under-expression of these genes in whole animals and ovaries but a trend to their over-expression in immune tissues. The construction of new cDNA libraries of symbiotic and asymbiotic animals challenged by pathogenic bacteria has initiated a new transcriptomics approach by RNA-Seq.

Therefore, the *Wolbachia* presence modifies immune system characteristics at cellular and humoral levels and the immunocompetence of *A. vulgare*. The study of new parameters will clarify if the *Wolbachia* presence is a real benefit to its host or if the bacteria do have a significant cost to its host.

Remerciements

Tout d'abord, merci à l'ensemble des membres de mon jury, Yannick, Fabrice, Guillaume, Sébastien et Tristan d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à remercier en particulier Guillaume et Yannick pour avoir participé à mes comités de thèse et m'avoir conseillé tout au long de ce travail.

Un très grand merci à mes deux directeurs de thèse, Christine et Pierre, sans qui tout cela n'aurait pu être possible. Merci de m'avoir toujours accordé votre temps, de m'avoir prêté votre oreille, de m'avoir soutenu, guidé et aidé pendant ces trois années et demie et surtout d'avoir été très patient (entre mes étourderies et mes idées saugrenues...). Merci Christine de m'avoir poussé à prendre des responsabilités qui m'ont permis de grandir un peu plus ;-). Merci Pierre pour toutes nos discussions enrichissantes, ton esprit critique et ton argumentation imparable sur toute chose qui m'auront tant appris.

Un grand merci également à Didier pour m'avoir aidé sur ces satanées statistiques (m'y ferais-je un jour ?) et pour toutes les discussions intéressantes qui en ont découlé, pour m'avoir aidé à décrocher mon poste de moniteur qui m'a apporté tant de choses, pour m'avoir pardonné mes impertinences (les voies hiérarchiques sont parfois impénétrables) et pour toutes nos discussions informelles autour de la vie du labo, de tes expériences et de l'informatique.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire qui ont fait de cette thèse une période des plus agréables. Merci à l'équipe technique, Maryline pour m'avoir initié aux arcanes de la biologie cellulaire, Carine et Jérôme pour m'avoir tant aidé dans cette dernière ligne droite, Catherine, Alexandra pour votre aide, à tous pour vos conseils, nos discussions diverses et variées et tous ces moments si particuliers passés en salle de manip ou à l'élevage. Merci à Christelle, notre secrétaire de choc, pour m'avoir facilité la vie : entre les commandes et mes déplacements, ça n'a pas toujours été facile. Merci à Tiffany, pour le précieux temps que tu m'as fait gagner dans la préparation de mes TP. Merci aux chercheurs pour toutes nos discussions passionnantes ! Merci particulièrement à Joanne et Mathieu qui ont participé de très près à ce travail et qui ont eu pour moi toujours de très bons conseils.

Merci aux habitants passés et présents de la salle des étudiants (comme on aime si bien nous le rappeler) et aux jeunes non permanents expérimentés : Vincent (en souvenir de nos 50 cm qui nous séparaient mais qui ont été si agréables...), Sam, Nico, Gaël, Lise, Jessica, Isabelle, Sébastien L., Sébastien V., à nos amazones de passage Lenka et Sandrine, à nos étrangers, Hajer, Mehdi, Dalila, Mauricio, Gipo, à mes petits stagiaires, Cédric et Romain. Merci pour toutes ces tranches de rigolades, ces soirées et ces moments de détente !

Merci à Franck, Adriana et Yann pour m'avoir permis de développer des techniques, d'établir des collaborations et pour toutes nos discussions scientifiques ou non.

Merci aux nombreuses personnes dont les noms m'échappent à l'heure à laquelle j'écris ces lignes mais qui ont permis de près ou de loin à ce travail de s'accomplir.

Merci aux moniteurs, François, Laure, Sylvain, Hélène, Caroline, Sophie, Em-

manuelle, Sébastien et les autres pour les bons moments passés ensemble et pour ce superbe atelier projet mémorable où désir et réalité se sont croisés l'espace d'un instant. Merci à Pauline, pour tous ces moments partagés, pour tout ce que tu m'as apporté et que je n'ai pu te rendre...

Merci aux membres de l'ADBEP pour toutes ces expériences et ces bons moments passés ! C'était vraiment une bonne aventure !...

Merci à Anne-So et Marcou (pour m'avoir accueilli durant mon premier jour sur Poitiers et pour m'avoir fait visiter cette belle ville), Lulu, Vincent, Julie M. et Olivier, Julie C., Caro, à mes chers amis de longue date qui m'ont soutenu et dont je n'ai pas assez pris de nouvelles...

Merci à mes parents et à mon frère, sans qui tout cela n'aurait pu être possible à tout point de vue. Merci de m'avoir soutenu et désolé de ne pas toujours avoir été disponible.

Enfin, merci à Winka pour m'avoir apporté tant de choses, pour ton amour, ta patience et tes bons petits plats... Je souhaite à tous de vivre une fin de thèse comme je l'ai vécu...

Sommaire

Résumé	3
Abstract	5
Remerciements	7
Liste des figures	17
Liste des tableaux	19
Liste des abréviations	21
I Introduction	23
II Réponses immunitaires, immunocompétence et symbiose	29
1 Immunité et immunocompétence chez les crustacés	31
1.1 Les effecteurs	31
1.2 L'hématopoïèse	33
1.3 Les réactions immunitaires	37
1.3.1 Détection des agents pathogènes	37
1.3.2 Activité phénoloxydase	39
1.3.3 Phagocytose, encapsulement et nodulation	41
1.3.4 Stress oxydant	42
1.3.5 Facteurs antimicrobiens	44
1.3.6 Coagulation	45
1.3.7 Défenses antivirales	46

1.4	L'immunité innée « adaptative »	47
1.5	L'immunocompétence	49
1.5.1	Mesure et paramètres immunitaires	50
1.5.2	Causes et conséquences des variations de l'immuno- compétence	52
2	Impact des symbioses sur l'immunité	53
2.1	La symbiose : caractéristiques, filtres de rencontre et de com- patibilité	54
2.2	La symbiose à <i>Wolbachia</i>	56
2.2.1	Phénotypes induits par <i>Wolbachia</i>	57
2.2.2	Impacts de <i>Wolbachia</i> sur l'immunocompétence de ses hôtes	60
2.2.3	Relations entre <i>Wolbachia</i> et l'immunité d' <i>A. vulgare</i>	62
 III Résultats		65
 1 Impact de la symbiose à <i>Wolbachia</i> sur le système immunitaire d'<i>A. vulgare</i>		69
1	<i>Wolbachia</i> et le système immunitaire	69
1.1	Organes hématopoïétiques et libération des hémocytes	71
1.2	Quantification de <i>Wolbachia</i> dans les cellules du système im- munitaire	73
1.3	Impact de la présence de <i>Wolbachia</i> sur les proportions hémocytaires	75
1.3.1	Cytométrie en flux	75
1.3.2	Cytocentrifugation	77
2	Conclusion et perspectives	78

2	Conséquences de la symbiose à <i>Wolbachia</i> sur l'immunocompétence d'<i>A. vulgare</i>	81
1	Impacts de la présence de <i>Wolbachia</i> sur les paramètres immunitaires	83
1.1	Taux d'hémocytes circulants et activité PO	83
1.2	Phénomènes apoptotiques des cellules immunitaires	85
1.2.1	Organes hématopoïétiques et apoptose	86
1.2.2	Hémocytes et apoptose	87
1.2.3	Discussion	92
1.3	Impact de la présence de <i>Wolbachia</i> sur d'autres paramètres immunitaires	93
1.3.1	Capacité phagocytaire	95
1.3.2	Encapsulement et étalement cellulaire	97
2	Impact de <i>Wolbachia</i> sur l'immunocompétence	101
2.1	Infections bactériennes	101
2.2	Infections fongiques	106
3	Conclusion et perspectives	107
3	Conséquences de la symbiose à <i>Wolbachia</i> sur l'expression de gènes de l'immunité	111
1	ANR EndoSymbArt (2006–2010) : première approche transcriptomique massive sur <i>A. vulgare</i>	113
1.1	Réalisation des banques d'ADNc et séquençage	113
1.2	Analyse bioinformatique	115
2	Exploitation du premier transcriptome de référence d'isopode	115
2.1	Identification des gènes immunitaires	115
2.2	Quantification de l'expression de gènes de l'immunité	119
2.3	Conclusion	125
3	ANR ImmunSymbArt (2010–2013) : une nouvelle approche focalisée sur le système immunitaire	126

3.1	Réalisation de banques d'ADNc du système immunitaire et d'animaux entiers infectés par des agents pathogènes	127
3.2	Acquisition et traitement des données	130
4	Conclusion et perspectives	130
IV	Discussion générale	133
V	Matériels et Méthodes	141
1	Matériel biologique	143
2	Prélèvement du matériel biologique	144
2.1	Prélèvement de l'hémolymphe	144
2.2	Prélèvement des ovaires et des organes hématopoïétiques . . .	144
3	Vérification du statut symbiotique	146
3.1	Extraction d'ADN	146
3.2	PCR de détection de <i>Wolbachia</i>	146
4	Quantification de l'activité phénoloxydase	147
5	Gradient continu de Percoll	148
6	Cytocentrifugation et coloration des hémocytes	148
7	Microscopie électronique à transmission	149
7.1	Hémocytes	149
7.2	Organes hématopoïétiques	150
8	Cytométrie en flux	150
9	Quantification des phénomènes apoptotiques	151
9.1	Microscopie confocale	151
9.2	Cytométrie en flux	152
10	Injections de billes	153
10.1	Phagocytose	153
10.2	Encapsulement	153

11	Infections expérimentales	155
11.1	Infections bactériennes	155
11.2	Infections fongiques	156
11.3	Analyse statistique	156
12	Quantification de l'expression de gènes	156
12.1	Extractions des ARN totaux	156
12.2	Rétrotranscription	158
12.3	PCR quantitative	158
13	Banques d'ADNc du projet ANR ImmunSymbArt	159
13.1	Extractions d'ARN totaux	159
13.2	Rétrotranscription et amplification des ADNc	160
 Bibliographie		 163
 Publications		 193

Liste des figures

II-1	Les différents types hématocytaires chez les crustacés illustrés chez <i>Homarus americanus</i>	32
II-2	Schéma simplifié de l'hématopoïèse chez les crustacés décapodes .	34
II-3	Schéma synthétique des principales réactions immunitaires chez les crustacés	36
II-4	Phylogénie de <i>Wolbachia</i>	58
II-5	Les différents supergroupes des <i>Wolbachia</i>	58
III-1	Structures des organes hématopoïétiques d' <i>A. vulgare</i>	70
III-2	Détection de <i>Wolbachia</i> par FISH dans les hématocytes circulants et les organes hématopoïétiques	72
III-3	Profil des populations hématocytaires d' <i>A. vulgare</i>	74
III-4	Observation des trois types hématocytaires d' <i>A. vulgare</i> après cyto- centrifugation sur lame et coloration Hemacolor®	77
III-5	Variation de la densité hématocytaire et de l'activité PO	82
III-6	Marquage TUNEL réalisé sur des organes hématopoïétiques d' <i>A.</i> <i>vulgare</i>	86
III-7	Marquage TUNEL réalisé sur des hématocytes d' <i>A. vulgare</i>	87
III-8	Fenêtrage type issu du marquage de l'apoptose par Annexine V / Iodure de propidium	88
III-9	Proportion des phénomènes apoptotiques des hématocytes de fe- melles <i>A. vulgare</i> asymbiotiques (<i>w</i> −) au cours du vieillissement .	90

III-10	Proportion des phénomènes apoptotiques des hémocytes de femelles <i>A. vulgare</i> symbiotiques ($w+$) au cours du vieillissement . .	90
III-11	Proportion des phénomènes apoptotiques des hémocytes de femelles <i>A. vulgare</i> asymbiotiques ($w-$) et symbiotiques ($w+$) tout âge confondu	91
III-12	Fenêtrage issu de l'analyse de l'hémolymphe d' <i>A. vulgare</i> montrant la séparation des évènements fluorescents (Q1-1) des évènements non fluorescents (Q3-1)	94
III-13	Quantité d'hémocytes d' <i>A. vulgare</i> ayant phagocyté 1 à 6 billes fluorescentes	94
III-14	Cinétique des capacités phagocytaires totales au sein de l'hémolymphe analysée par cytométrie en flux	96
III-15	Répartition des évènements fluorescents dans les populations P1 et P2	96
III-16	Billes de Sephadex [®] encapsulées par des femelles <i>A. vulgare</i> . . .	98
III-17	Courbes de survie d' <i>A. vulgare</i> infectés par des bactéries Gram(+) (<i>B. megaterium</i> , <i>S. lugdunensis</i>) au mode de vie extracellulaire . .	100
III-18	Courbes de survie d' <i>A. vulgare</i> infectés par des bactéries Gram(+) (<i>L. ivanovii</i>) et Gram(−) (<i>Sa. typhimurium</i>) au mode de vie intracellulaire	102
III-19	Courbes de survie d' <i>A. vulgare</i> infectés par des bactéries Gram(−) (<i>V. alginolyticus</i> , <i>E. coli</i>) au mode de vie extracellulaire	104
III-20	Principales voies immunitaires connues chez les crustacés	116
III-21	Evolution du THC sur une période de 24h chez les femelles symbiotiques et asymbiotiques ainsi que chez des males infectés par un cocktail de Gram(+), de Gram(−) ou avec <i>L. ivanovii</i>	128
V-1	Schéma de la disposition des organes hématopoïétiques par rapport au vaisseau dorsal chez <i>A. vulgare</i>	145

Liste des tableaux

III-1	Micro-organismes utilisés pour les infections expérimentales	101
III-2	Ensemble des banques d'ADNc du projet EndoSymbArt	114
III-3	Liste des gènes de l'immunité identifiés dans les différentes banques d'ADNc	120
III-4	Expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire d' <i>A.</i> <i>vulgaris</i>	123
III-5	Ensemble des banques d'ADNc du projet ImmunSymbArt	127
V-1	Conditions de culture et origine des micro-organismes utilisés pour les infections expérimentales	154

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ALF	<i>Anti-lipopolysacharride factor</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptides</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
DAP	Diaminopimélique
DO	Densité optique
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
IC	Incompatibilité cytoplasmique
IP	Iodure de propidium
MAMP	<i>Microbial-associated molecular pattern</i>
MAS	<i>Modified Alsever's solution</i>
pb	paire de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	PCR quantitative
PGN	Peptidoglycanes

proPO	Prophénoloxydase
PRR	<i>Pathogen recognition receptor</i>
PO	Phénoloxydase
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
RT	Rétrotranscription
SOD	Superoxyde dismutase
SSH	<i>Suppression subtractive hybridization</i>
TCT	<i>Tracheal cytotoxin</i>
THC	Taux d'hémocytes circulants
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling</i>

Première partie

Introduction

La symbiose, qui dans son sens étymologique signifie vivre avec, constitue l'interaction entre êtres vivants la plus répandue sur Terre. En effet, il n'existe probablement sur la planète aucun organisme qui ne vive associé avec un autre (Combes 1995 ; Douglas 2010 ; Thomas *et al.* 2007). Ces symbioses, qui se caractérisent par des interactions durables entre un hôte (le plus gros) et un symbiote (le plus petit), engendrent des pressions de sélection aboutissant à l'optimisation de l'association. Ces interactions entraînent par exemple la sélection de mécanismes de défense chez l'hôte ou de facteurs de virulence chez le symbiote. Cette course aux armements (ou théorie de la Reine Rouge, Van Valen 1973) entre un symbiote et son hôte conduit à l'adaptation de l'expression des gènes des deux partenaires qui peut aller jusqu'à une modification structurelle de leurs génomes (réduction de taille, élimination de gènes redondants, etc.) (Combes 1995 ; Dale et Moran 2006 ; Fellous et Salvaudon 2009). Toutefois, ces interactions ne sont pas toutes de même nature. Alors que certaines relations seront à bénéfice réciproque pour les partenaires (mutualisme), d'autres ne serviront les intérêts que d'un partenaire au détriment du second (parasitisme). La plupart des interactions se situeront entre ces deux situations extrêmes, le long d'un continuum allant du parasitisme au mutualisme (Combes 1995). La nature plus ou moins mutualiste ou parasitaire d'une interaction n'est également pas figée dans le temps et peut évoluer le long de ce continuum selon les intérêts de chacun des partenaires (Fellous et Salvaudon 2009 ; Leigh 2010 ; Thrall *et al.* 2007). Cette évolution peut aussi être modulée en fonction de la pression induite par les éléments biotiques et abiotiques de l'environnement (Leigh 2010 ; Thrall *et al.* 2007). Quoiqu'il en soit, pour qu'une relation soit durable, elle doit être régulée par les deux partenaires : dans une relation mutualiste, l'hôte doit préserver le symbiote qui, de son côté, doit avoir une virulence atténuée ; dans une relation parasitaire, l'hôte doit contrôler le symbiote (à défaut de pouvoir l'éliminer car trop coûteux en terme d'énergie) alors que le symbiote doit échapper aux défenses de l'hôte (Combes 1995). En conséquence, ces associations modifient le phénotype de chaque partenaire (phénotype

étendu issu de la conjugaison de deux génomes) et leur valeur sélective. La symbiose constitue ainsi une force évolutive majeure permettant de nombreuses adaptations des partenaires. En particulier dans la réponse des hôtes aux agents pathogènes, un nombre croissant d'études montre le rôle des symbiotes dans la modulation de l'efficacité du système immunitaire (Chow *et al.* 2010 ; Gross *et al.* 2009 ; Kitano et Oda 2006 ; Welchman *et al.* 2009). Il n'a cependant pas été déterminé à l'heure actuelle si les symbiotes modulent directement le système immunitaire de l'hôte ou s'ils interagissent avec l'agent pathogène (compétition, favoritisation).

Chez les métazoaires, la défense de l'organisme repose en très grande partie sur le système immunitaire qui reconnaît le non soi et permet ainsi de lutter contre les agents pathogènes ou de réguler les populations de symbiotes. Ce système immunitaire est classiquement divisé en deux types : le système immunitaire inné, que l'on retrouve chez tous les métazoaires et dont l'ensemble des composants est donné à la naissance et n'évolue qu'au gré des mutations, et le système immunitaire acquis, qui n'existe que chez les Vertébrés et dont les composants sont générés par recombinaison génique et sélectionnés au gré des interactions (Brostoff *et al.* 2002). Si le système immunitaire acquis fait l'objet de très nombreuses études, notamment chez les Vertébrés, l'immunité innée n'a été explorée que plus récemment, en particulier chez des organismes modèles tels que les insectes *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* et *Bombyx mori*, les mollusques *Biomphalaria glabrata* et *Crassostrea gigas*, le chélicérate *Limulus polyphemus* ou le crustacé *Pacifastacus leniusculus*. Cette immunité innée est extrêmement efficace puisque, à elle seule, elle permet à 95% des métazoaires, soit l'ensemble des Invertébrés, d'éliminer efficacement les agents pathogènes ou de réguler leurs symbiotes (Brostoff *et al.* 2002). Ces Invertébrés sont constitués en très grande partie par les euarthropodes au sein duquel on trouve le groupe majeur des pancrustacés lui-même constitué de deux grands ensembles : les crustacés et les insectes. Les études sur *D. melanogaster* ont permis de faire de remarquables avancées dans la compréhension du système immunitaire des Invertébrés.

Cependant, l'émergence d'autres espèces modèles, en particulier chez les crustacés telles que l'écrevisse *P. leniusculus* ou la crevette *Penaeus monodon*, a permis de mettre en évidence d'autres mécanismes ou l'implication de nouvelles molécules, montrant ainsi la diversité insoupçonnée des réactions qui peuvent être mises en place pour lutter contre le non soi. Par ailleurs, les crustacés constituent un modèle particulièrement intéressant pour étudier cette diversité puisqu'ils ont colonisé tous les milieux (marin, d'eau douce mais également terrestre) dont les contraintes différentes ont entraîné une adaptation du système immunitaire au cours de l'évolution.

Parmi ces crustacés, au sein de l'ordre des isopodes, un groupe a adopté un mode de vie terrestre : le sous-ordre des Oniscidae. De nombreuses espèces de ce groupe hébergent un endosymbiote bactérien : l' α -protéobactérie *Wolbachia* (Bouchon *et al.* 2008). Cette bactérie, identifiée à la fois chez les arthropodes et chez certains nématodes, constitue l'un des endosymbiotes les plus répandus sur Terre (Werren *et al.* 2008). *Wolbachia* entretient une très grande diversité d'interactions avec ses hôtes, que l'on peut replacer sur le continuum mutualisme/parasitisme, illustrant parfaitement les différents types de relations symbiotiques. De plus, un nombre croissant d'études montre que *Wolbachia* est impliquée dans la modulation de la réponse des hôtes aux agents pathogènes (Bian *et al.* 2010 ; Fytrou *et al.* 2006 ; Glaser et Meola 2010 ; Hedges *et al.* 2008 ; Kambris *et al.* 2010 ; Osborne *et al.* 2009 ; Teixeira *et al.* 2008). Ainsi, l'ensemble de ces données fait des crustacés infectés par *Wolbachia* des modèles pertinents pour étudier l'influence des symbiotes sur la réponse immunitaire des hôtes.

Deuxième partie

Réponses immunitaires, immunocompétence et symbiose

1 Immunité et immunocompétence chez les crustacés

L'étude des systèmes immunitaires d'invertébrés modèles a permis d'appréhender des mécanismes de l'immunité innée d'une finesse et d'une efficacité de plus en plus insoupçonnée (Iwanaga et Lee 2005 ; Lackie 1980 ; Loker *et al.* 2004). Chez les crustacés, de tels mécanismes ont pu être mis en évidence par les recherches menées ces dernières années sur les effecteurs et sur les voies cellulaires et humorales impliquées dans la réponse aux agents pathogènes (Vazquez *et al.* 2009). Leur caractérisation a permis l'identification de réponses spécifiques du système immunitaire. La quantification de ces réponses, que l'on peut décliner en terme de paramètres immunitaires, permet d'estimer le niveau d'immunocompétence d'un individu, ce niveau traduisant la capacité de cet individu à répondre à une infection (Adamo 2004b ; Schulenburg *et al.* 2009).

L'ensemble des données acquises sur l'immunité des crustacés qui sera synthétisé dans cette partie est issu de travaux réalisés principalement sur les décapodes et plus particulièrement sur des groupes d'intérêt économique tels que les crevettes et les écrevisses. Décapodes et isopodes sont relativement apparentés puisque ces deux groupes appartiennent à la classe des Malacostracés.

1.1 Les effecteurs

Chez les crustacés, contrairement à beaucoup d'invertébrés, la réponse immunitaire est réalisée principalement par un seul type d'effecteur : les hémocytes. Il s'agit d'effecteurs cellulaires circulant librement dans l'hémolymphe. Ils sont impliqués dans la mise en place d'une réponse immunitaire sur le lieu d'infection. Cette réponse comprend deux composantes : la réponse humorale, impliquant des facteurs hémolympatiques libres ou libérés par les hémocytes, et la réponse cellulaire impliquant directement les hémocytes (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Ces hémocytes sont

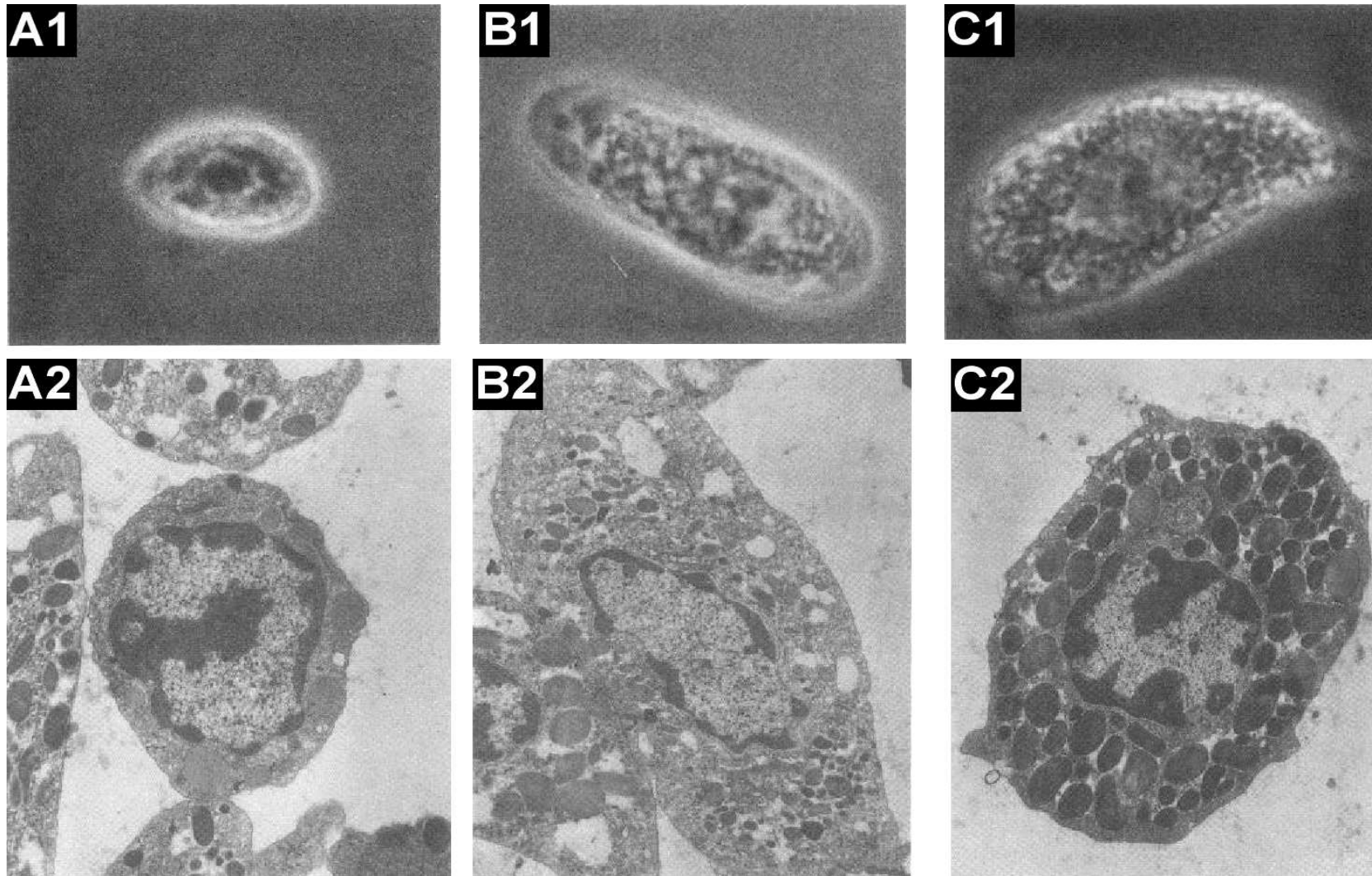


FIGURE II-1 – Les différents types hémocytaires chez les crustacés illustrés chez *Homarus americanus* : les hémocytes hyalins (**A**), les hémocytes semi-granulaires (**B**) et les hémocytes granulaires (**C**) en microscopie optique (**1**) et électronique (**2**) (modifié d'après Hose *et al.* (1990)).

généralement répartis en trois types aux caractéristiques cytologiques propres : les hémocytes hyalins, ayant un cytoplasme dépourvu de granules, les hémocytes semi-granulaires, possédant des granules de petites et moyennes tailles, et les hémocytes granulaires, ayant des granules de grandes tailles (Bauchau 1981) (Figure II-1). Bien que classiquement les hémocytes hyalins soient associés à la phagocytose, les hémocytes semi-granulaires à l'encapsulation et les hémocytes granulaires à la libération de facteurs hémolymphatiques (Bauchau 1981), de nombreuses études tendent à démontrer que la concordance entre catégorie cytologique et fonction peut varier. En effet, des différences peuvent être observées à la fois selon l'espèce considérée et selon le stimulus utilisé pour induire une réponse immunitaire (bactéries Gram(+), ou Gram(-), levures, billes de latex, etc.) (pour revue Matozzo et Marin 2010).

En plus de ces principaux effecteurs, un autre organe semble aussi participer à la réponse immunitaire : l'hépatopancréas (James *et al.* 2010). Cette glande digestive est impliquée dans la synthèse d'un grand nombre de protéines, qui peuvent être présentes dans l'hémolymphe où elles participent à la réponse humorale. Ces protéines peuvent avoir une action localisée, lorsqu'elles sont activées par des cascades protéolytiques issues d'hémocytes (Gai *et al.* 2009 ; Li *et al.* 2010 ; Wang *et al.* 2009b), ou une action systémique, comme les peptides antimicrobiens (James *et al.* 2010 ; Soonthornchai *et al.* 2010).

1.2 L'hématopoïèse

L'importance du rôle joué par les hémocytes dans la défense de l'individu nécessite une production continue de ces cellules afin de combler les pertes engendrées par le vieillissement naturel ou suite à une réaction immunitaire qui conduisent à leur mobilisation ou à leur destruction (Söderhäll *et al.* 2003). Ce renouvellement continu est assuré par l'organe hématopoïétique au sein duquel se déroule l'hématopoïèse. Il s'agit d'un processus physiologique caractérisé par deux phénomènes : la

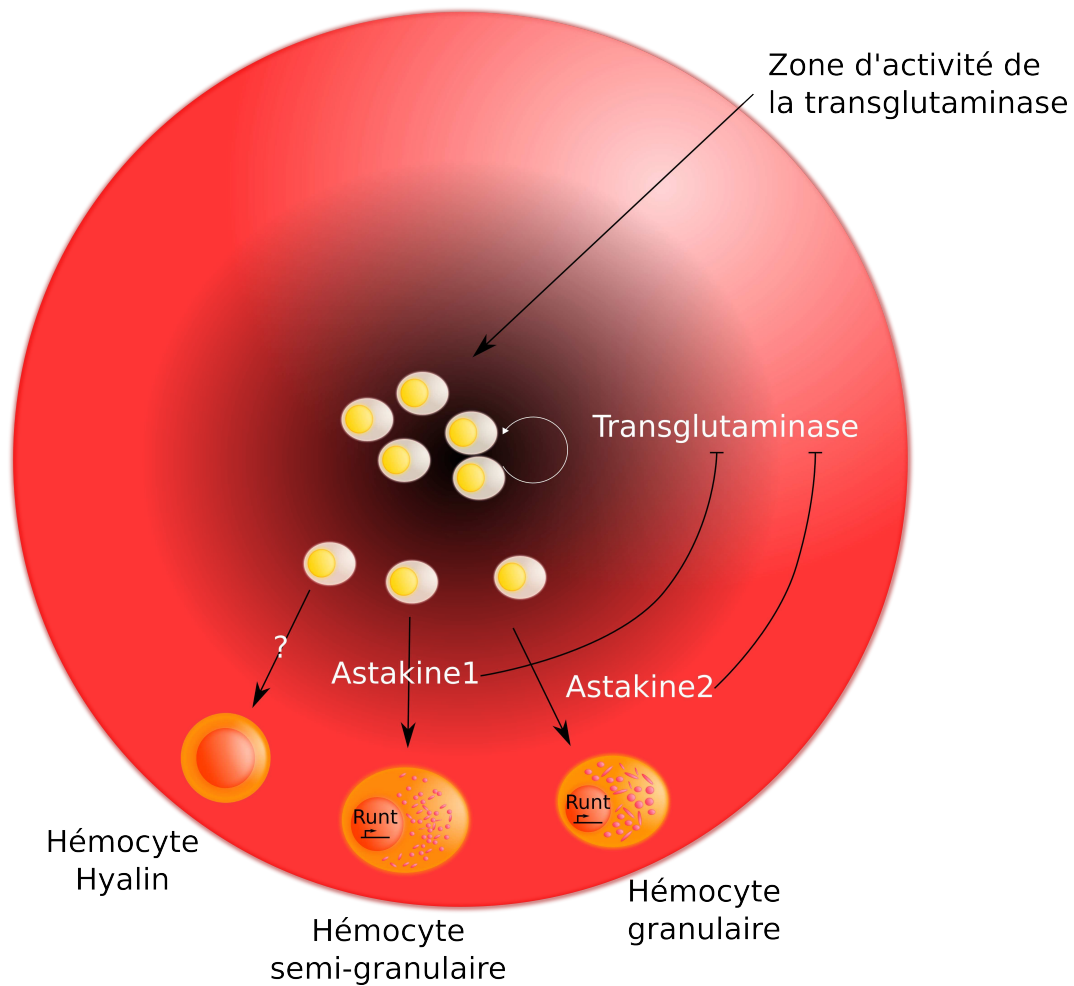


FIGURE II-2 – Schéma simplifié de l'hématopoïèse chez les crustacés décapodes. Les hémocytes indifférenciés au centre de l'organe hématopoïétique sont maintenus dans cet état par l'activité de la Transglutaminase. Ils migrent ensuite vers les bords de l'organe où les Astakines initient leur différenciation en hémocytes hyalins, semi-granulaires et granulaires.

multiplication cellulaire, visant à renouveler le stock de cellules souches, et la différenciation de ces dernières en types hématocytaires spécialisés (Johansson *et al.* 2000 ; Söderhäll *et al.* 2003). Le maintien d'un équilibre entre cellules souches et hématocytes est soumis à des phénomènes complexes de régulation d'expression génique (Braun et Woollard 2009 ; Wang *et al.* 2010).

Chez les crustacés, quelques gènes de régulation de l'hématopoïèse ont été identifiés (Figure II-2). Ainsi, chez l'écrevisse *P. leniusculus*, le maintien de l'état indifférencié des cellules souches est dépendant de l'activité extracellulaire d'une enzyme sécrétée par ces dernières, la Transglutaminase (Lin *et al.* 2008), enzyme initialement identifiée comme une molécule de l'immunité intervenant dans la coagulation (Kopáček *et al.* 1993). Ce maintien indifférencié peut être rompu sous l'action d'une famille de gènes, la famille des astakines, correspondant aux premières cytokines impliquées dans l'hématopoïèse identifiées chez les Invertébrés (Lin et Söderhäll 2011 ; Söderhäll *et al.* 2005). Les astakines sont des protéines possédant un domaine prokinéticine, les prokinéticines étant impliquées dans l'hématopoïèse des Vertébrés (Monnier et Samson 2008). La famille des astakines est composée de deux gènes : astakine 1 et astakine 2. L'astakine 1 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules souches en hématocytes semi-granulaires (Lin *et al.* 2010). Son expression réprime l'activité extracellulaire de la Transglutaminase ce qui induit une migration des cellules et une perte de leur état indifférencié (Lin *et al.* 2008). De plus, l'astakine 1 induit l'expression d'un autre gène hématopoïétique : le gène runt (Söderhäll *et al.* 2005). Ce gène code un facteur de transcription de la famille des gènes runx induisant la différenciation des cellules souches en hématocytes semi-granulaires et granulaires (Söderhäll *et al.* 2003). L'astakine 2, quant à elle, induit la différenciation des cellules souches en hématocytes granulaires (Lin *et al.* 2010). Les gènes impliqués dans la différenciation des cellules souches en hématocytes hyalins ne sont pas connus. Lorsque l'ensemble des processus de différenciation est achevé, les hématocytes quittent l'organe hématopoïétique pour rejoindre la circulation générale.

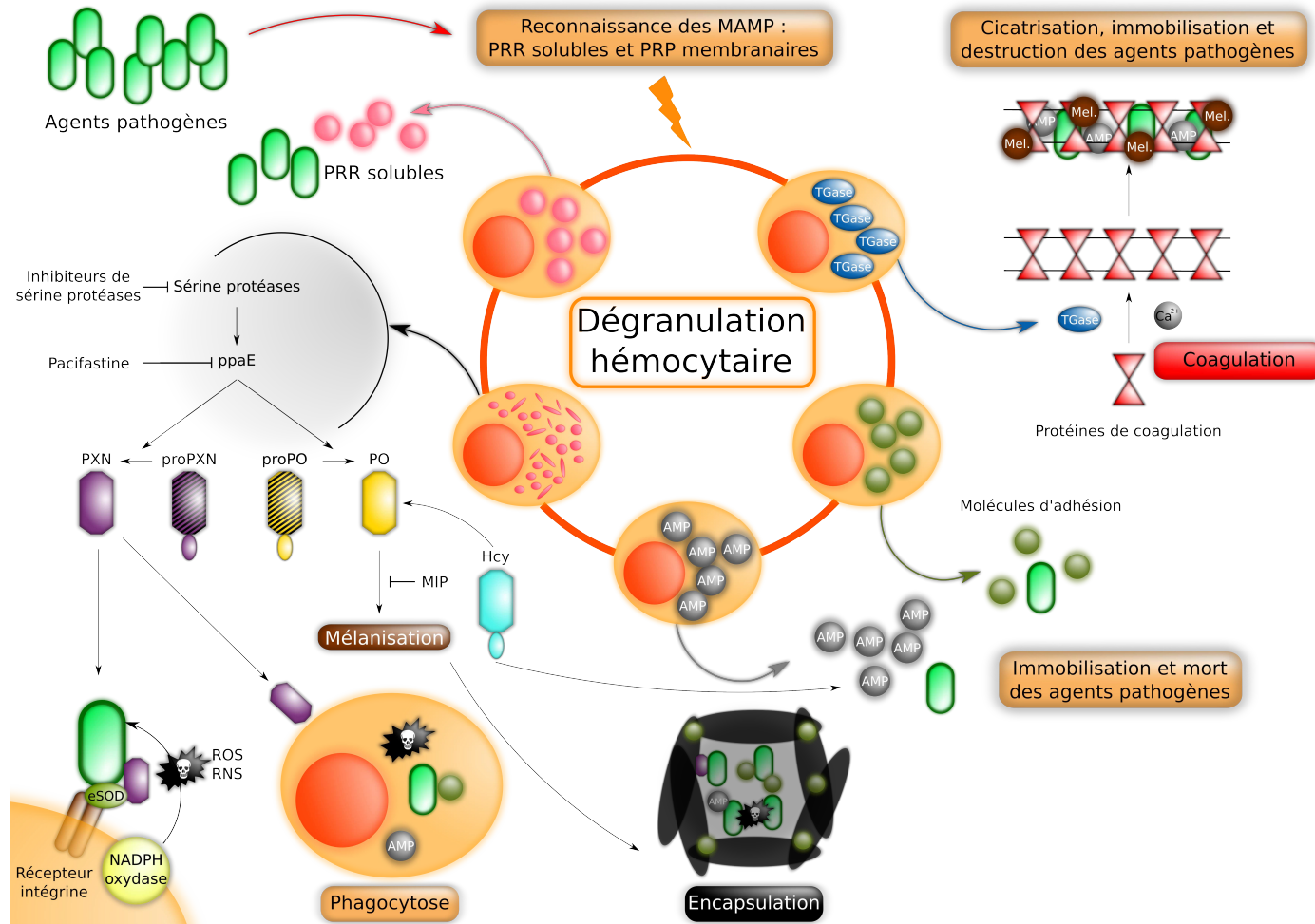


FIGURE II-3 – Schéma synthétique des principales réactions immunitaires chez les crustacés. Lorsqu'un agent pathogène (bactéries, champignons, virus) pénètre dans l'organisme, deux types de réactions sont mises en place par les hémocytes : les réactions humorales induites par la dégranulation hémocytaire qui libère des facteurs antibactériens (AMP, lysozyme) ou conduisant à la production de mélanine, de produits du stress oxydant (ROS, RNS), et les réactions cellulaires se traduisant par la phagocytose et l'encapsulement.

L'hématopoïèse implique aussi d'autres gènes ou molécules dont le rôle exact n'a pas encore été caractérisé. Ainsi l'extinction par interférence ARN du gène codant la prophénoloxydase (proPO), enzyme impliquée dans la mélanisation, induit une chute du nombre d'hémocytes circulants (Fagutao *et al.* 2009). Cette même approche réalisée sur un autre gène nommé *Hemocyte Homeostasis-Associated Protein* (HHAP), nouvellement identifié chez la crevette *Pe. monodon* et l'écrevisse *P. leniusculus*, induit également une chute du nombre de cellules circulantes, accompagnée de déformations cellulaires des hémocytes observés (Prapavorarat *et al.* 2010). Inversement, l'injection de lysozymes, facteurs antimicrobiens, chez la crevette *Litopenaeus stylirostris* induit une augmentation du nombre d'hémocytes circulants (Mai et Wang 2010).

1.3 Les réactions immunitaires

Dès que les hémocytes rejoignent la circulation générale, ils sont aptes à mettre en place une réponse immunitaire rapide et efficace afin de circonscrire toute infection. Une telle infection peut survenir lorsque des agents pathogènes (bactéries, champignons ou virus) franchissent les défenses physiques qui protègent l'arthropode, à savoir la cuticule et la barrière intestinale essentiellement. Cette réponse efficace se déroule en deux temps : tout d'abord la détection des corps étrangers puis leur élimination suite à la mise en place de deux types de réactions : (i) les réactions humorales, incluant l'activité phénoloxydase, l'induction d'un stress oxydant, la libération de facteurs antimicrobiens et la coagulation, et (ii) les réactions cellulaires, à savoir la phagocytose et l'encapsulation (Figure II-3).

1.3.1 Détection des agents pathogènes

Chaque micro-organisme pathogène porte à sa surface des déterminants nommés *Microbial-Associated Molecular Patterns* (MAMP). Ces MAMP, absents des organismes pluricellulaires animaux et végétaux, sont des molécules glycosylées très

conservées car elles jouent un rôle essentiel dans la structure des parois. Cette caractéristique est exploitée par le système immunitaire pour reconnaître de manière spécifique tous les agents pathogènes exprimant ce type de déterminants (Welchman *et al.* 2009). Parmi ces MAMP, on distingue trois grandes familles : les β -1,3-glucanes des champignons et des bactéries Gram(+), les lipopolysaccharides des bactéries Gram(−) et les peptidoglycanes (PGN) de type Lysine et de type Diaminopimélique (DAP) ou de type *tracheal cytotoxin* (TCT – dérivés de type DAP) des bactéries Gram(+) (Lemaitre et Hoffmann 2007).

Les MAMP des micro-organismes pathogènes sont détectés à l'aide de récepteurs particuliers appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRR) (Vazquez *et al.* 2009) (Figure II-3). Ces PRR ne sont pas liés à un type d'agents pathogènes mais sont spécifiques d'un MAMP. Parmi ces PRR, on distingue : les *β -1,3-Glucan Binding Proteins* (β GBP) et les *Gram(−) Binding Protein* (GNBP) spécifiques des glucanes, les *Lipopolysaccharide/Glycan binding proteins* (LGBP) spécifiques des lipopolysaccharides et des glycanes et les lectines spécifiques des peptidoglycanes (Vazquez *et al.* 2009). Bien qu'encore non identifiée chez les crustacés, une autre famille majeure de PRR existe chez les Invertébrés : la famille des *Peptidoglycan Receptor Proteins* (PGRP) spécifiques des peptidoglycanes (Dziarski et Gupta 2006). Parmi l'ensemble de ces récepteurs, certains peuvent être libres dans l'hémolymphe (cas des β GBP, des GNBP, de certains PGRP et lectines) (Vazquez *et al.* 2009 ; Welchman *et al.* 2009), d'autres associés à la membrane cytoplasmique (cas de certains PGRP et lectines) (Vazquez *et al.* 2009 ; Welchman *et al.* 2009) ou intracellulaires (cas du PGRP-LE) (Charroux *et al.* 2009).

Lorsqu'ils se lient aux MAMP, les PRR permettent aux hémocytes de détecter la présence d'agents pathogènes. Cette présence est indiquée directement par le PRR si celui-ci est membranaire ou intracellulaire. Lorsque le PRR est libre dans l'hémolymphe, la présence des agents pathogènes est indiquée soit par fixation du complexe MAMP/PRR sur des récepteurs membranaires des hémocytes (*e.g.* lectines) (Jira-

vanichpaisal *et al.* 2006), soit par l'activation des protéines ligands qui vont se lier à leur récepteur également localisé sur la membrane des hémocytes (*e.g.* le récepteur Toll et son ligand Spätzle) (Ashok 2009 ; Charroux *et al.* 2009 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006).

Lorsque la présence d'agents pathogènes est ainsi détectée par les hémocytes, un ensemble de réactions cellulaires et humorales est initié. Chez les crustacés, ces réactions sont réalisées en grande majorité par les différents types hémocytaires. L'une des premières réactions sera l'exocytose des contenus granulaires des hémocytes conduisant à la libération de nombreux effecteurs tels que la proPO ou les peptides antimicrobiens, et l'activation des enzymes produisant des espèces réactives de l'oxygène ou de l'oxyde nitrique (Figure II-3).

1.3.2 Activité phénoloxydase

La phénoloxydase (PO) est un effecteur humoral clé libéré par les hémocytes. Cette enzyme génère une activité PO caractérisée par l'apparition de mélanine, pigments bruns/noirs, colorant les tissus. Ce phénomène est appelé mélanisation. Les produits intermédiaires et finaux de la mélanisation sont plus ou moins toxiques pour les agents pathogènes mais aussi pour les cellules de l'organisme infecté. En effet, la mélanine est le résultat de l'oxydoréduction de composés phénoliques conduisant à la production d'intermédiaires cytotoxiques tels que les quinones (Cerenius *et al.* 2008 ; Nappi et Christensen 2005). Cette mélanisation a deux rôles immunitaires : un rôle « actif » en tant qu'agent microbiostatique ou microbicide (Cerenius *et al.* 2010a) et un rôle « passif » en rigidifiant des structures issues de la réaction cellulaire tels que les capsules (Cerenius *et al.* 2008 ; Nappi *et al.* 2005).

De part la nocivité des produits générés, une régulation fine de cette activité PO est nécessaire dans le temps et l'espace afin d'éviter des phénomènes d'auto-immunité (Cerenius *et al.* 2008, 2010b). Le premier élément de régulation de l'activité PO se situe au niveau de l'enzyme elle-même. En effet, lorsqu'elle est libérée

par les hémocytes, l'enzyme se trouve sous forme de zymogène, la proPO. Cette dernière est activée par une cascade protéolytique, libérée également par les hémocytes et constituée d'un ensemble de sérines protéases s'activant séquentiellement par clivage pour aboutir au clivage de la proPO en PO (Cerenius *et al.* 2008) (Figure II-3). Cette cascade protéolytique constitue par ailleurs le deuxième point de régulation de l'activité PO car elle est à son tour régulée par un ensemble d'inhibiteurs de protéases (serpines, pacifastines, α 2-macroglobulines) (Cerenius *et al.* 2008) (Figure II-3). Enfin, un troisième niveau de régulation est assuré par les *Melanisation Inhibition Proteins* (MIP) qui limitent l'activité PO (Söderhäll *et al.* 2009), selon un mécanisme d'action encore inconnu (Cerenius *et al.* 2010b) (Figure II-3).

Bien que l'on trouve une activité PO dans les principaux groupes d'invertébrés étudiés à ce jour (Cerenius *et al.* 2008), cette activité ne semble pas être systématiquement assurée par une enzyme PO dédiée. En effet, chez des arthropodes comme les chélicérates (Burmester 2002) et quelques crustacés (Smith et Söderhäll 1991), le gène proPO semble absent. L'activité PO détectée pourrait être alors réalisée par une autre molécule, l'hémocyanine, dont l'activité PO a été montrée *in vitro* chez de très nombreux arthropodes (Decker et Jaenicke 2004) comprenant certains crustacés tels que *Bathynomus giganteus* (Pless *et al.* 2003), *L. vannamei* (García-Carreño *et al.* 2008) et *Porcellio scaber* (Jaenicke *et al.* 2009) (Figure II-3). Cette protéine plasmatique, présente en grande quantité dans l'hémolymphe des arthropodes, a pour fonction principale le transport du dioxygène (Burmester 2002). L'hémocyanine et la PO sont phylogénétiquement proches puisque les gènes codant ces protéines dérivent d'un gène ancestral commun qui aurait codé une protéine à activité PO (Burmester 2002). L'hémocyanine de certaines espèces semble donc avoir conservé cette activité PO qui, à l'image de l'enzyme PO, ne peut être révélée qu'après une activation dont les modalités sont assez mal comprises à l'heure actuelle (Decker *et al.* 2007).

1.3.3 Phagocytose, encapsulement et nodulation

En parallèle des réactions humorales, des réactions cellulaires telles que la phagocytose ou l'encapsulement participent à la défense de l'organisme.

Les cellules phagocytaires se caractérisent par un comportement particulier : après attachement du corps étranger à la membrane (qu'il soit biotique ou abiotique), la cellule modifie son cytosquelette afin de former des pseudopodes qui entoureront complètement ce corps et l'internaliseront au sein de ce qui va devenir un phagosome. Lorsque la phagocytose est réalisée, le phagosome fusionne avec un lysosome (organite contenant de nombreuses enzymes lytiques) pour former un phagolysosome au sein duquel sont réalisées la dégradation et l'assimilation du corps étranger (Bayne 1990). L'efficacité de la phagocytose peut être renforcée par l'action de molécules appelées opsonines. Ces molécules ont la capacité, d'une part, de reconnaître et de se lier aux MAMP et, d'autre part, d'être reconnues par des récepteurs spécifiques de la membrane des hémocytes (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). La fixation de ces opsonines facilite l'adhésion cellulaire et initie la phagocytose des agents pathogènes ainsi fixés (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Chez les crustacés, de nombreuses opsonines ont été identifiées : les lectines (Vazquez *et al.* 2009), les protéines masquerade-like (Jiravanichpaisal *et al.* 2006) et la péroxynektine, molécule clé activée par une cascade protéolytique identique à celle de la proPO et impliquée dans d'autres fonctions comme la production de molécules microbicides (activité peroxydase) et l'induction de la dégranulation (Sritunyaluksana *et al.* 2001) (Figure II-3). Ces opsonines sont aussi capables d'initier deux autres réactions cellulaires, l'encapsulement et la nodulation.

Encapsulement et nodulation se mettent en place lorsque les corps étrangers sont respectivement trop imposants ou trop nombreux pour être phagocytés (Vazquez *et al.* 2009) (Figure II-3). Ces réponses relativement similaires visent à éliminer les corps étrangers ou au moins à limiter leur croissance et leurs mouvements (Cerenius *et al.* 2010a ; Vazquez *et al.* 2009). Contrairement à la phagocytose, ces réactions

impliquent un nombre important d'hémocytes qui s'agglutinent en couches concentriques autour du corps étranger sans espaces intercellulaires et probablement de manière hermétique au dioxygène (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Chez les crustacés, les cellules relarguent au sein de cette capsule ou de ce nodule le contenu protéique de leurs granules, ce qui aboutit à la production de molécules cytotoxiques (telles que des quinones et de la mélanine produites par la PO, des espèces moléculaires réactives impliquées dans le stress oxydant) et à la lyse enzymatique des parois des micro-organismes ciblés (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Par ailleurs, la mélanisation est aussi impliquée dans la rigidification des capsules et nodules afin d'éviter tout délitement de la structure formée (Cerenius *et al.* 2008 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006 ; Nappi *et al.* 2005).

1.3.4 Stress oxydant

La production de molécules cytotoxiques est une composante importante du système immunitaire. En effet, ce type de molécule intervient dans de nombreuses réactions, que ce soit lors de la phagocytose (présence au sein des phagolysosomes) (Lam *et al.* 2010), de l'encapsulation (présence au sein de la capsule) (Jiravanichpaisal *et al.* 2006 ; Nappi et Christensen 2005) mais aussi directement dans l'hémolymphe (Cerenius *et al.* 2010a ; Nappi et Christensen 2005) (Figure II-3). Ces produits sont de puissants agents microbicides du fait de leur très forte réactivité vis-à-vis des molécules organiques (lipides, acides aminés, acides nucléiques, etc.) engendrant ainsi un stress oxydant (Avery 2011). Ce stress se traduit par l'apparition, chez l'organisme ciblé, de molécules péroxydées qui deviennent alors non fonctionnelles et toxiques (Avery 2011).

Ce stress oxydant est induit par deux types d'espèces réactives : les espèces réactives de l'oxygène (ou *Reactive Oxygen Species* (ROS)) et les espèces réactives de l'azote (ou *Reactive Nitrogen Species* (RNS)) (Figure II-3). Ces espèces réactives sont produites par les hémocytes (Bell et Smith 1993 ; Rodríguez-Ramos *et al.* 2010)

mais aussi par des molécules hémolympatiques ayant des capacités oxydantes telles que la PO (Cerenius *et al.* 2008 ; Nappi et Christensen 2005) et l'hémocyanine (Jiang *et al.* 2007).

Chez les crustacés, la production de ces espèces réactives par les hémocytes fait intervenir des voies de synthèse spécifiques (Figure II-3). Ainsi, les ROS intra ou extracellulaires sont produits par la NAD(P)H-oxydase membranaire (Bell et Smith 1993 ; Cerenius *et al.* 2008). Cette production passe par la synthèse d'un anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) très instable conduisant à la formation, spontanée (par l'intermédiaire d'ions) ou par réactions enzymatiques, de diverses molécules oxydantes comme les radicaux hydroxyles ($HO^{\bullet}$), les singulets de dioxygène (1O_2) (la demi-vie de ces deux éléments étant très brèves), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les ions hydroxydes (HO^-) ou l'acide hypochloreux ($HOCl$) (la demi-vie des ces trois éléments étant relativement plus longue) (Lam *et al.* 2010). Les RNS sont quant à eux produits par la *Nitric Oxide Synthase* (NOS) dont l'expression, au niveau du système immunitaire, est inductible (iNOS) (Rivero 2006 ; Rodríguez-Ramos *et al.* 2010). La synthèse des RNS est réalisée à partir de la L-arginine et génère des radicaux d'oxyde nitrique ($NO^{\bullet}$) très instables conduisant à la formation instantanée de peroxydinitrites ($OONO^-$) (élément hautement toxique à la demi-vie brève), de nitrites (NO_2^-) et de nitrates (NO_3^-) (éléments moins toxiques aux demi-vies relativement plus longues) (Rivero 2006).

De part la haute toxicité de ces espèces réactives, une détoxification efficace doit être mise en œuvre rapidement par les tissus producteurs afin d'éviter des phénomènes d'auto-immunité. L'organisme intrusif peut aussi utiliser les mêmes mécanismes de détoxification afin d'éviter tout dommage. Cette détoxification peut être « active » par la production d'enzymes de détoxification telles que la Superoxyde Dismutase (SOD), la Glutathione Peroxydase, la Peroxyrédoxine, pour les ROS (Limón-Pacheco et Gonsebatt 2009) ou la *Nitric Oxide Reductase* (NOR) et la *Nitric Oxide Dioxygenase* (NOD) pour les RNS (Gardner *et al.* 1998), ou « passive »

par la présence de molécules s'oxydant préférentiellement en présence d'espèces réactives comme les caroténoïdes et l'acide ascorbique pour les ROS (Arrigoni et Tullio 2002 ; Bendich et Olson 1989) ou l'hémoglobine pour les RNS (Frey et Kallio 2005 ; Hourdez *et al.* 2000).

1.3.5 Facteurs antimicrobiens

Des facteurs antimicrobiens, autres molécules cytotoxiques, sont également libérés au cours de la réponse immunitaire. Ils sont représentés en grande partie par les peptides antimicrobiens (ou *antimicrobial peptide* (AMP)) (Figure II-3) mais aussi par des lysozymes.

Les peptides antimicrobiens sont largement répandus dans le règne vivant (López-Meza *et al.* 2011 ; Thomas *et al.* 2009). L'étude de ces peptides a révélé des caractéristiques communes à l'ensemble de ces molécules : ce sont des peptides ou polypeptides à forte activité antibactérienne, antifongique ou antivirale, dont le mode d'action est très varié. En effet, certains destabilisent les membranes phospholipidiques par leur caractère amphiphile conduisant à la lyse des cellules par la formation de pores alors que d'autres peuvent entraîner une inhibition de la biosynthèse des membranes (Shai 1999). Ces peptides peuvent ainsi tuer ou inhiber la croissance de la plupart des micro-organismes. Les virus peuvent également constituer une cible de ces peptides. Bien que leurs modes d'action restent assez méconnus, ils pourraient destabiliser les capsides virales ou se fixer sur les protéines permettant l'entrée du virus dans la cellule hôte mais aussi agir directement sur les cellules hôtes infectées en les détruisant (Falco *et al.* 2009).

Les peptides antimicrobiens peuvent être regroupés dans des grandes familles partageant des caractéristiques structurales communes. Chez les crustacés, trois de ces grandes familles ont été identifiées : les crustines (Smith *et al.* 2008 ; Tassanakajon *et al.* 2010), les penaeidines (propre à la famille des crevettes Penaeidae) (Cuthbertson *et al.* 2008 ; Tassanakajon *et al.* 2010) et les *anti-lipopolysaccharide factors*

(ALF) (Tassanakajon *et al.* 2010).

Les lysozymes sont quant à eux des enzymes antimicrobiennes qui se caractérisent par une activité hydrolytique des peptidoglycanes conduisant à la lyse des micro-organismes mais aussi à la stimulation du système immunitaire par la libération de MAMP (Callewaert et Michiels 2010) (Figure II-3). Récemment, leur implication dans l'immunité antivirale a été montrée chez les crustacés : les lysozymes auraient un effet direct sur les particules virales sans que les mécanismes sous-jacents ne soient encore connus (Mai et Wang 2010).

La synthèse de l'ensemble de ces facteurs antimicrobiens est assurée principalement par les hémocytes (Vazquez *et al.* 2009). L'hépatopancréas, au sein duquel des gènes codant ce type de facteur s'expriment, pourrait également participer de façon secondaire à la production de facteurs antimicrobiens (James *et al.* 2010 ; Soonthornchai *et al.* 2010). D'autre part, il a été montré que des peptides antimicrobiens de crustacés pouvaient également être générés par clivage de protéines de grandes tailles comme l'hémocyanine (Decker et Jaenicke 2004). Ceci a été démontré chez les crevettes *L. vannamei* et *L. stylirostris* (Destoumieux-Garzón *et al.* 2001) ainsi que chez l'écrevisse *P. leniusculus* (Lee *et al.* 2003) où une cystéine protéase, libérée dans le plasma par les hémocytes lors de la réponse immunitaire, est à l'origine de ce clivage (Lee *et al.* 2003).

1.3.6 Coagulation

Bien que l'ensemble des réactions décrites précédemment permet de limiter efficacement une infection, il est impératif pour l'organisme de contrôler le déplacement des agents pathogènes mais aussi, en cas de blessure, d'éviter l'entrée de nouveaux micro-organismes et d'endiguer les pertes d'hémolymphe. La coagulation permet dans ce cas de circonscrire ces phénomènes (Theopold *et al.* 2002). Chez les crustacés, cette réaction fait intervenir deux types de protéines : les protéines de coagulation et une enzyme permettant leur polymérisation (Cerenius *et al.* 2010b)

(Figure II-3).

Les protéines de coagulation sont des glycoprotéines de masse moléculaire élevée (200 kDa) qui sont présentes dans le plasma sous forme monomérique ou dimérique (Hall et Söderhäll 1994 ; Yeh *et al.* 1999). Elles sont produites dans l'hétopancréas et libérées dans la circulation générale (Hall *et al.* 1999), suite à la détection de corps étrangers ou à une blessure (Cerenius *et al.* 2010b ; Theopold *et al.* 2002). Ces protéines forment alors de longs polymères sous l'action d'une enzyme Ca^{2+} -dépendante, la Transglutaminase (Kopáček *et al.* 1993) (Figure II-3). Cette Transglutaminase, produite au sein des tissus épithéliaux et des hémocytes (Yeh *et al.* 1999), est libérée dans l'hémolymphe et crée des liaisons covalentes entre les chaînes latérales d'une lysine et d'une glutamine portées par les protéines de coagulation (Hall *et al.* 1999 ; Kopáček *et al.* 1993).

L'efficacité de la coagulation peut être augmentée par certains mécanismes. En effet, en plus des protéines de coagulation, des $\alpha 2$ -macroglobulines (inhibiteurs de sérines protéases), qui présentent des résidus lysines et glutamines libres, peuvent être intégrées au sein de ces polymères. La présence des $\alpha 2$ -macroglobulines dans les agrégats de coagulation permettrait alors d'inhiber l'action des protéases produites par les micro-organismes (Hall et Söderhäll 1994).

1.3.7 Défenses antivirales

De nombreux virus étant responsables de pertes considérables au sein des élevages d'espèces d'intérêt économique, l'immunité antivirale des crustacés a fait l'objet de nombreuses recherches au cours de ces 15 dernières années (Flegel 2007, 2009 ; Johnson *et al.* 2008 ; Leu *et al.* 2009 ; Lightner 1996 ; Lightner *et al.* 1997 ; Liu *et al.* 2009 ; Robalino *et al.* 2007). Il a été mis en évidence que cette immunité repose en partie sur des effecteurs immunitaires déjà caractérisés : des PRR impliqués spécifiquement dans la détection des virus, des opsonines de type lectine, des facteurs antimicrobiens tels les AMP ou les lysozymes (Liu *et al.* 2009). Au-delà des

mécanismes « classiques » déjà décrits, des mécanismes antiviraux beaucoup plus spécifiques ont été révélés, notamment l'interférence ARN.

L'interférence ARN est un mécanisme très conservé chez les eucaryotes qui permet de réguler l'expression des gènes lorsque ces derniers sont transcrits d'une façon anormalement élevée, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène tels que les gènes viraux. Ce mécanisme implique la production de petits fragments d'ARN interférents (ARNi) d'une vingtaine de paires de base issus de la digestion par l'enzyme Dicer d'un ARNm double brin (Chowdhury et Novina 2005). Ces ARNi sont ensuite intégrés au sein d'un complexe protéique *RNA-induced silencing complex* (RISC) permettant la reconnaissance spécifique d'autres ARNm de même séquence et entraînant soit leur dégradation soit l'inhibition de leur traduction (Sabin *et al.* 2010). Chez les crustacés, l'implication de l'interférence ARN dans l'immunité antivirale a été démontrée (Robalino *et al.* 2007). Cette immunité se caractérise par une interférence ARN tout d'abord locale au niveau du tissu infecté puis systémique, c'est-à-dire dans l'ensemble des tissus de l'organisme infecté (Robalino *et al.* 2007).

D'autres mécanismes sont aussi impliqués dans la défense antivirale. Il s'agit principalement de mécanismes concernant l'homéostasie intra ou intercellulaire. Parmi ces mécanismes, l'autophagie (ou plus particulièrement la xénophagie) joue un rôle majeur par la destruction des particules virales présentes au sein de la cellule (Johnson *et al.* 2008). L'apoptose des cellules infectées est également un autre mécanisme majeur mis en place dans le ralentissement de la synthèse des particules virales ainsi que dans l'élimination des particules intracellulaires (Johnson *et al.* 2008).

1.4 L'immunité innée « adaptative »

L'immunité des crustacés (et plus généralement des Invertébrés) se caractérise par un ensemble de réponses rapides et efficaces mais présentant une spécificité moindre comparée à l'immunité acquise des Vertébrés qui peut générer un immense répertoire d'anticorps (Brostoff *et al.* 2002). En effet, chez les Invertébrés, il est

communément admis qu'aucune immunité acquise n'est présente. Cette immunité acquise, propre aux Vertébrés, confère certains avantages : bien que sa mise en place soit plus lente que celle de l'immunité innée, sa haute spécificité limite les risques d'auto-immunité et permet la mise en place d'une réponse plus rapide et plus économique en terme d'énergie lors d'une nouvelle infection par un agent pathogène déjà rencontré, assurant ainsi une valeur sélective (ou *fitness*) de l'individu plus élevée. Cependant, durant cette dernière décennie, des preuves attestent de l'existence d'une immunité spécifique chez les Invertébrés. Ceci a permis d'établir un nouveau concept : l'immunité innée « adaptative » des Invertébrés (Kurtz et Franz 2003 ; Little *et al.* 2003 ; Moret et Siva-Jothy 2003).

Pour qu'une immunité innée « adaptative » puisse se mettre en place, au moins une des trois conditions suivantes est nécessaire : une diversité importante des PRR (existence d'un polymorphisme génétique allélique ou possibilité de recombinaison génique), des interactions synergiques entre PRR (augmentation du nombre d'interactions possibles entre PRR et type de MAMP) et des effets doses (boucle de rétroaction positive au niveau de l'expression d'effecteurs/récepteurs) (Schulenburg *et al.* 2007). Ces conditions semblent avoir trouvé, très récemment, des éléments de validation. Ainsi deux familles de gènes permettant de produire un nombre important de PRR ont été identifiées : les gènes *Down Syndrome Cell Adhesion Molecule* (Dscam) chez les insectes et crustacés (Cherry et Silverman 2006 ; Ghosh *et al.* 2010), permettant la production d'une très grande variété d'ARNm par recombinaisons exoniques ($\sim 40\,000$), et les gènes *Fibrinogen-related proteins* (FREPs) chez les mollusques et les insectes (Ghosh *et al.* 2010), pouvant subir des réarrangements géniques. D'autre part, il a été mis en évidence de nombreuses interactions entre PRR déjà décrits : c'est le cas pour les PGRP où différentes combinaisons d'interaction permettent d'induire des réponses spécifiques (Charroux *et al.* 2009). Quant à l'effet dose, il a été montré qu'une infection pouvait induire une sur-expression transitoire des gènes codant des PRR même après élimination de l'agent patho-

gène (Schulenburg *et al.* 2007). De ce fait, cet effet dose est à mettre en relation avec un autre phénomène caractéristique de l'immunité innée « adaptative », l'immunisation ou *priming*, qui permet la mise en place d'une réponse plus rapide et plus efficace lors d'infections récurrentes par un même agent pathogène (Schulenburg *et al.* 2007). Cette immunisation a été mise en évidence entre autre chez des crustacés tels que la daphnie *Daphnia magna* (Little *et al.* 2003), le copépode *Macrocyclus albidus* (Kurtz et Franz 2003), et l'isopode terrestre *Pe. scaber* (Roth et Kurtz 2009). Cette immunisation semble pouvoir être transmise à la descendance dans certains cas : chez *Da. magna*, la descendance résiste plus efficacement à l'infection d'un agent pathogène si la mère y a été exposé (Little *et al.* 2003) et chez *Pe. monodon*, les individus résistent mieux à des infections virales si leur parent leur transmettent des fragments inactifs du génome viral (Tang et Lightner 2006).

1.5 L'immunocompétence

L'efficacité du système immunitaire peut se traduire par sa capacité à répondre à une infection, ce que l'on définit comme l'immunocompétence d'un individu (Adamo 2004b ; Siva-Jothy 1995). Si durant l'interaction avec un agent pathogène, le niveau d'immunocompétence de l'individu est suffisant pour combattre l'infection, l'agent pathogène sera éliminé. Dans le cas contraire, l'individu mourra. Cette victoire n'est pas sans coût sur la valeur sélective de l'individu, ce coût étant fonction de l'investissement qui aura été fourni pour combattre l'infection. Minimiser ce coût tout en maintenant une efficacité maximum des réactions immunitaires constitue alors un avantage adaptatif incontestable.

Alors que le coût de l'investissement est assez difficile à quantifier, le niveau d'immunocompétence peut être estimé en mesurant un certain nombre de paramètres du système immunitaire. Ce niveau d'immunocompétence n'est cependant pas forcément stable tout au long de la vie d'un individu et peut varier au cours du temps en fonction de l'évolution de plusieurs facteurs écologiques abiotiques ou biotiques.

1.5.1 Mesure et paramètres immunitaires

A l'image du chat mort-vivant de Schrödinger¹, le niveau d'immunocompétence d'un individu ne peut-être connu qu'à l'issue de l'interaction entre l'organisme et son agent infectieux. Bien que ce niveau ne peut être connu dans l'absolu, il peut être corrélé à l'état du système immunitaire de l'individu : plus le système immunitaire est performant, plus le niveau d'immunocompétence est élevé.

La quantification de réactions spécifiques du système immunitaire, permettant de diagnostiquer son état, peut être réalisée de deux façons : soit globalement par la mesure du taux de survie d'individus infectés par un agent pathogène (Gagnaire *et al.* 2007 ; Glaser et Meola 2010 ; Hedges *et al.* 2008 ; Moreira *et al.* 2009 ; Moret et Siva-Jothy 2003 ; Teixeira *et al.* 2008), soit par la mesure d'un paramètre précis d'une réaction immunitaire. Ces paramètres peuvent concerner différentes réactions :

- les réactions cellulaires telles que la capacité phagocytaire (Gagnaire *et al.* 2007 ; Li *et al.* 2007 ; Manfredini *et al.* 2010 ; Morga *et al.* 2009) et l'encapsulation (Fytrou *et al.* 2006 ; Vainio *et al.* 2004) ainsi que le taux d'hémocytes circulants (THC) (Cornet *et al.* 2009 ; Le Moullac et Haffner 2000 ; Matozzo et Marin 2010),
- les réactions humorales comme l'activité PO (Babin *et al.* 2010 ; Cornet *et al.* 2009 ; Moret et Siva-Jothy 2003 ; Thomas *et al.* 2011), la production d'espèces réactives de l'oxygène (Gagnaire *et al.* 2007 ; Morga *et al.* 2009) et les activités antimicrobiennes (Adamo 2004a ; Gagnaire *et al.* 2007 ; Li *et al.* 2007 ; Moret et Siva-Jothy 2003).

1. Le chat mort-vivant de Schrödinger est une expérience de pensée en physique quantique proposée par H. Schrödinger. Cette expérience relie l'état d'une particule à l'état mort ou vivant d'un chat *via* une fiole de poison qui se brise lors d'un changement d'état de la particule. Il est communément admis en physique quantique qu'une particule se trouve en superposition d'état jusqu'à son observation. Par conséquent, si l'on transpose ce concept à une échelle macroscopique par l'intermédiaire du chat, avant toute observation, le chat est dans une superposition d'état (mort et vivant) jusqu'à l'observation de son état. Cette image est intéressante du point de vue de l'immunocompétence car elle reflète ce qui se déroule au sein de l'individu. En effet, chez ce dernier, il est très difficile de connaître le niveau de l'ensemble des réactions immunitaires (état de la particule) impliquées dans la lutte contre l'agent infectieux. Par conséquent, la victoire ou la défaite du système immunitaire (changement d'état de la particule) ne peut être connu qu'à l'issue de l'interaction (observation du chat).

Toutefois, la quantification de paramètres immunitaires est à considérer avec prudence. En effet, autant la mesure de survie suite à une infection par un agent pathogène donne une idée précise de la compétence immunitaire face à cet agent pathogène, autant la mesure d'un paramètre particulier d'une réaction ne permet pas forcément de déduire la sensibilité ou la résistance d'un individu face à cet agent pathogène. Par exemple chez le grillon *Gryllus texensis*, la sensibilité ou la résistance aux bactéries du genre *Serratia* n'a pu être corrélée à la faible ou la forte activité des lysozymes pourtant impliquées dans la réponse immunitaire face à cet agent pathogène et mesurée avant l'infection (Adamo 2004a).

Ce constat peut s'expliquer par la complexité de la réponse immunitaire et par la limitation des ressources allouées à l'immunité (Adamo 2004b). En effet, l'interconnexion des différentes voies impliquées dans la réponse immunitaire peut conduire à des phénomènes de compensation, à savoir qu'une voie « déficiente », même de manière temporaire, pourra être suppléée par une autre voie. D'autre part, les ressources énergétiques allouées à l'immunité sont généralement supérieures au besoin strict d'une réponse immunitaire. Autrement dit, un paramètre peut présenter des variations entre individus sans pour autant que ces individus deviennent sensibles à un agent pathogène, tant que le niveau le plus bas observé de ce paramètre est suffisant pour éliminer cet agent pathogène. Enfin, l'allocation des ressources au sein du système immunitaire peut varier entre individus : un individu présentant un paramètre « déficient » peut en réalité avoir investi moins d'énergie dans ce paramètre pour allouer cette énergie à un autre paramètre tout aussi efficace dans la lutte contre un agent pathogène, l'énergie totale allouée au système immunitaire étant identique à d'autres individus.

Par conséquent, pour pallier ces difficultés d'estimation, deux stratégies peuvent être mises en place. La première consiste à étudier quelques paramètres, en parallèle d'une étude globale sur la survie à un agent pathogène donné. Cette approche permet de valider ou d'invalidier le ou les paramètres choisis, en établissant une relation

a posteriori entre ces paramètres et la pertinence de leur mesure, c'est-à-dire leur implication dans la survie de l'individu (Adamo 2004a). La seconde solution est la mesure d'un nombre important de paramètres permettant d'avoir une représentation globale de l'état du système immunitaire (Adamo 2004b). Ainsi, la probabilité de mal estimer l'implication d'un paramètre défini *a priori* comme reflétant l'immunocompétence d'un individu est grandement diminuée.

1.5.2 Causes et conséquences des variations de l'immunocompétence

Les variations de l'immunocompétence peuvent être provoquées par des facteurs intrinsèques à l'animal, tels que l'allocation des ressources, mais également par des facteurs extrinsèques abiotiques ou biotiques. Les facteurs abiotiques sont très variés : les éléments toxiques (minéraux ou organiques), les variations circadiennes ou saisonnières ou les variations physico-chimiques (température, dioxygène, etc). Ainsi, chez certains décapodes, une chute du THC est observée en présence de polluant, lors de marées basses ou de baisses de températures (Le Moullac et Haffner 2000). La réponse cellulaire peut elle aussi être modulée : une chute de l'activité phagocytaire est corrélée à une baisse de la température chez *Homarus americanus* (Le Moullac et Haffner 2000). La réponse humorale peut également se retrouver amoindrie : une chute de l'activité PO chez *Crangon crangon* et de la production d'espèces réactives chez *L. stylirostris* sont corrélées respectivement à la présence de polluants et à la diminution de la concentration en dioxygène (Le Moullac et Haffner 2000). Enfin, les rythmes circadiens et saisonniers influencent l'hématopoïèse des crustacés (Le Moullac et Haffner 2000 ; Watthanasurorot *et al.* 2011). Concernant les facteurs biotiques, on distingue principalement les traits d'histoire de vie et plus particulièrement, ceux liés à l'alimentation (disponibilité et prise de nourriture), au sexe, à l'âge ou encore à la présence d'un organisme étranger (Babin *et al.* 2010 ; Cornet *et al.* 2009 ; Schulenburg *et al.* 2009).

Comme les conséquences de ces variations d'immunocompétence ne sont percep-

tibles qu'à l'issue d'une infection par un agent pathogène (Cornet *et al.* 2009), le niveau d'immunocompétence a donc un effet direct sur la valeur sélective de l'individu (Duncan *et al.* 2006). En effet, pour qu'un individu puisse assurer sa reproduction, il est nécessaire qu'il survive, entre autre, aux infections. Ainsi, les individus ayant le meilleur niveau d'immunocompétence pour un milieu donné avec ses infections potentielles aura une valeur sélective élevée et pourra transmettre ces gènes à travers la population (Duncan *et al.* 2006). Toutefois, les interactions écologiques entre individus et agents pathogènes sont très complexes et d'autres mécanismes peuvent compenser une immunocompétence « non adaptée » telles que des comportements d'évitement, minimisant la rencontre avec l'agent pathogène (Schulenburg *et al.* 2009). Bien que les facteurs pouvant influencer sur l'immunocompétence d'un individu sont variés, un nombre croissant d'études montre l'importance d'un facteur biotique : la présence d'un symbiote et, plus particulièrement, d'un endosymbiote. En effet, les endosymbiotes, présents au sein de l'hôte, sont les plus à même d'interagir avec le système immunitaire et ceci afin d'assurer leur propre reproduction. Ils peuvent ainsi avoir un impact majeur sur l'immunité de leur hôte pouvant aboutir à des modifications importantes du système immunitaire et, par extension, de l'immunocompétence, la renforçant ou la diminuant.

2 Impact des symbioses sur l'immunité

L'influence de micro-organismes symbiotiques dans la réponse des hôtes aux agents pathogènes est de plus en plus démontrée. De nombreuses études menées ces dernières années mettent en évidence que la présence de symbiotes peut moduler les capacités du système immunitaire dans la lutte contre les éléments infectieux ou dans la limitation de la densité des agents pathogènes qu'ils véhiculent (Brownlie et Johnson 2009 ; Chaves *et al.* 2009 ; Hughes *et al.* 2011 ; Kambris *et al.* 2010 ; Moreira *et al.* 2009 ; Xi *et al.* 2008).

Les arthropodes constituent d'excellents modèles pour étudier ces mécanismes car ils sont très souvent associés à des micro-organismes symbiotiques dont ils dépendent pour leur nutrition ou leur reproduction et avec lesquels ils entretiennent des interactions couvrant l'ensemble du continuum du parasitisme au mutualisme (Bouchon *et al.* 2008 ; Hosokawa *et al.* 2010 ; O'Neill *et al.* 1997). Parmi ces arthropodes, certains sont des vecteurs d'agents pathogènes humains ou d'animaux d'élevage ou sont eux-mêmes des ravageurs de cultures. Ces caractéristiques majeures en font des modèles de choix dans la mise en place de nouvelles méthodes de lutte respectueuses de l'environnement. A cet égard, des stratégies de lutte biologique basées sur la symbiose (*Symbiont Based Protection* ou SyBaP) connaissent actuellement un développement rapide. Toutefois, l'application de ces méthodes ne pourra se faire que si l'on maîtrise les conditions d'établissement ou de régulation de la symbiose chez ces espèces.

2.1 La symbiose : caractéristiques, filtres de rencontre et de compatibilité

La symbiose se caractérise par une association durable entre deux organismes que l'on peut décomposer en différentes classes (en fonction de la balance coûts/bénéfices de l'association) du parasitisme au mutualisme (Combes 1995). Cette association peut revêtir un caractère obligatoire plus ou moins fort : en effet, parasitisme ou mutualisme entraînent une dépendance soit de l'hôte ou du symbiote vis-à-vis de son partenaire (association obligatoire pour l'un des deux) soit une interdépendance des deux partenaires (association obligatoire pour les deux) (Combes 1995). Indépendamment du caractère des associations, le degré d'intimité des deux partenaires est aussi très varié. Ainsi on observe là encore un continuum allant de l'ectosymbiose (où le symbiote vit sur l'hôte) à l'endosymbiose (où le symbiote vit dans l'hôte) (Combes 1995). Le cas d'intimité le plus extrême est celui de l'endocytobiose dans laquelle le symbiote vit à l'intérieur des cellules de l'hôte.

Dans tous les cas, ces associations nécessitent d'abord une rencontre (filtre de rencontre) mais surtout une tolérance des partenaires (filtre de compatibilité). Pour satisfaire au filtre de rencontre, la condition *sine qua non* est que les deux partenaires vivent au moins transitoirement dans le même milieu, ce qui a conduit à la sélection de mécanismes favorisant cette rencontre (Combes 1995). Ces mécanismes peuvent être très divers : il peut s'agir d'une synchronisation de certaines activités des deux partenaires (émergence d'un partenaire lorsque l'autre partenaire se retrouve dans le même milieu), de l'attraction d'un partenaire par l'autre partenaire à travers la transmission d'une information (visuelle, chimique, etc.) ou, de façon plus poussée, d'une manipulation du comportement telle que l'inversion des tropismes observée chez le gammare *Gammarus pulex* parasité par l'acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis*. En parallèle de ces mécanismes permettant de satisfaire le filtre de rencontre, il existe un mécanisme permettant de s'en affranchir : la transmission verticale. Certaines bactéries endosymbiotiques se transmettent ainsi directement d'une génération à l'autre *via* les ovocytes (O'Neill *et al.* 1997). De ce fait, le symbiote est certain de rencontrer son hôte puisqu'il ne le quitte jamais.

Une fois le partenaire rencontré, encore faut-il satisfaire au filtre de compatibilité. Ce filtre comprend avant tout la capacité du symbiote à s'installer physiquement chez l'hôte. Pour cela, le symbiote est généralement muni d'un ensemble d'adaptations physiques ou moléculaires. Ainsi, chez les microsporidies, l'appareil d'extrusion leur permet de percer la cuticule de certains gammarés afin d'injecter leur corps cellulaire ou sporoplasme (Vivarès 1999). Chez le crabe *Carcinus maenas*, le crustacé parasite *Sacculina carcini* a développé des mécanismes moléculaires entraînant l'arrêt de la mue chez son hôte afin de s'y maintenir (Lebarbenchon *et al.* 2007). Au-delà de cette installation, une deuxième condition critique pour les partenaires doit être remplie : le maintien du symbiote chez cet hôte. La rupture de ce maintien se fait généralement suite à l'intervention du système immunitaire (Gross *et al.* 2009).

Dans le cas des endosymbioses, le système immunitaire peut précisément jouer

un rôle très important puisqu'il peut cibler directement le symbiote avec lequel il est susceptible d'être en contact. Pour éviter ou minimiser les réactions immunitaires, un dialogue moléculaire doit s'instaurer pour permettre une tolérance réciproque des deux partenaires. Ce dialogue peut avoir deux conséquences non exclusives : une immunodépression de l'hôte et une ségrégation du symbiote dans différents tissus ou cellules. Ces conséquences prennent différentes formes selon la nature de la relation symbiotique. Dans une relation parasitaire, le symbiote pourra mettre en place une immunodépression généralisée de son hôte (Cornet *et al.* 2009 ; Fytrou *et al.* 2006) ou ségréger dans un milieu immunoprotégé (tissu ou cellule) lui permettant ainsi d'échapper, au moins relativement, à la réponse immunitaire (Combes 1995). Dans une relation mutualiste, l'hôte peut immunodéprimer localement un organe spécialisé dans lequel sera préservé le symbiote. L'hôte conservera néanmoins toutes ses capacités immunitaires, y compris vis-à-vis du symbiote, entraînant obligatoirement la ségrégation de celui-ci dans cet organe comme cela a été montré chez les insectes (bactériome du charançon) (Anselme *et al.* 2006) et les mollusques (l'organe luminescent de la seiche) (McFall-Ngai *et al.* 2010).

Ces nombreuses barrières restreignent généralement les changements de partenaires à un spectre d'espèces relativement proches phylogénétiquement. Cependant, les études évolutives ont montrées que ces barrières ont pu être franchies plusieurs fois au cours de l'évolution, suggérant une très grande plasticité des symbiotes (Pontes *et al.* 2008). Dans ce contexte, il a été décrit que la bactérie *Wolbachia*, un endosymbiote à transmission verticale typique, peut également se transmettre de façon horizontale dans les populations (pour revue Merçot et Poinso 2009), ce qui expliquerait son spectre d'hôtes extrêmement étendu.

2.2 La symbiose à *Wolbachia*

La bactérie *Wolbachia pipientis* (que nous nommerons par la suite simplement *Wolbachia*) est un endosymbiote obligatoire qui présente la particularité de cou-

vrir tous les types d'interactions symbiotiques, du parasitisme (Min et Benzer 1997) au mutualisme (Hosokawa *et al.* 2010 ; Taylor *et al.* 2005). Cette particularité est d'autant plus étonnante que cet endocytobioté peut induire des modifications phénotypiques assez profondes chez son hôte en manipulant sa physiologie et particulièrement sa reproduction. L'apparition et la sélection de mécanismes conduisant à la manipulation de la reproduction ont ainsi favorisées l'expansion de *Wolbachia* dans les populations, ce qui permet de qualifier cette bactérie de « parasite du sexe ».

2.2.1 Phénotypes induits par *Wolbachia*

Wolbachia est une bactérie intracellulaire obligatoire qui se localise dans le cytoplasme des cellules hôtes, généralement à l'intérieur d'une vacuole (Martin *et al.* 1973 ; Siozios *et al.* 2008). Elle se transmet verticalement, de la mère aux descendants, par voie ovocytaire (Werren *et al.* 2008). Malgré l'absence de paroi bactérienne, les analyses du gène 16S ADNr ont montré que *Wolbachia* appartient au groupe des bactéries Gram(−), ses plus proches parents étant des bactéries intracellulaires des genres *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* et *Neorickettsia* (Breeuwer *et al.* 1992 ; O'Neill *et al.* 1992 ; Rousset *et al.* 1992 ; Werren *et al.* 2008). Elle fait partie d'un groupe monophylétique (ordre des Rickettsiales) situé à la base de l'arbre des α -protéobactéries (Werren *et al.* 2008) (Figure II-4).

Des phylogénies réalisées avec des marqueurs très variables permettent de regrouper les différentes souches de *Wolbachia* en 8 supergroupes plus ou moins bien établis nommés de A à H (Casiraghi *et al.* 2005 ; Lo et Evans 2007 ; Lo *et al.* 2002) (Figure II-5). La majorité des souches de *Wolbachia* infectant les arthropodes appartient aux supergroupes A et B (Werren *et al.* 1995). Toutes les souches de *Wolbachia* identifiées jusqu'à maintenant chez les crustacés isopodes terrestres appartiennent au supergroupe B (Bouchon *et al.* 1998 ; Cordaux *et al.* 2004 ; Wiwatanaratnabutr *et al.* 2009).

Du fait de sa transmission par voie ovarienne, les mâles représentent une impasse

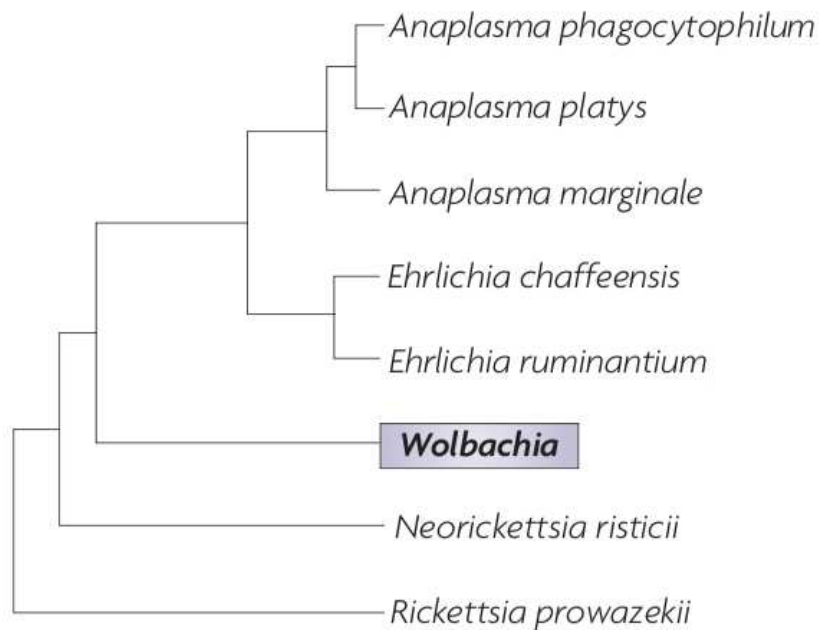


FIGURE II-4 – Phylogénie de *Wolbachia*. Position phylogénétique de *Wolbachia* par rapport à l'ordre des Rickettsiales faisant partie de la famille des Anaplasmataceae (Werren *et al.* 2008).

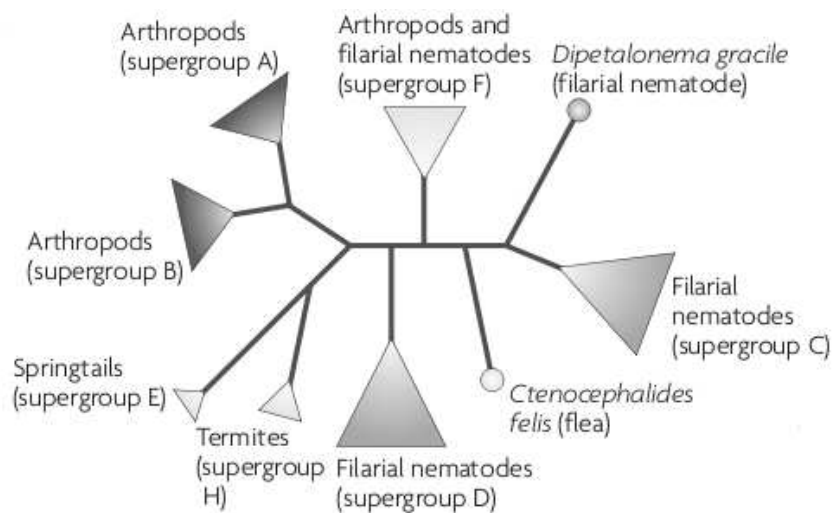


FIGURE II-5 – Les différents supergroupes des *Wolbachia*. Les *Wolbachia* sont regroupés en 8 supergroupes de A à H (Werren *et al.* 2008).

évolutive pour la bactérie. La dissémination de *Wolbachia* dans les populations est donc assurée par la mise en place de mécanismes favorisant la reproduction des femelles infectées ou la proportion de ces femelles dans les descendance. Quatre principaux phénotypes ont ainsi été décrits (Stouthamer *et al.* 1999 ; Werren *et al.* 2008) :

- l’incompatibilité cytoplasmique, qui constitue le cas le plus fréquemment observé, où les ovocytes fécondés issus d’un croisement entre un mâle infecté et une femelle non infecté ou entre individus infectés par des souches différentes de *Wolbachia* ne se développent pas (Serbus *et al.* 2008 ; Werren 1997),
- la parthénogenèse thélytoque au cours de laquelle les ovocytes non fécondés donnent naissance à des femelles (Huigens *et al.* 2000),
- la mort des mâles (ou *male killing*) qui se traduit par la mort des embryons mâles durant leur développement (Jaenike 2007),
- la féminisation, c’est-à-dire la transformation des mâles génétiques en femelles fonctionnelles (Bouchon *et al.* 2008).

Wolbachia, au-delà d’être un « parasite du sexe », peut établir diverses relations avec ses hôtes allant du parasitisme au mutualisme. Ainsi différents phénotypes ont pu être observés en fonction de la nature de la relation entre la bactérie et son hôte (Saridaki et Bourtzis 2010 ; Werren *et al.* 2008).

Le premier effet parasitaire mis en évidence concerne une souche de *Wolbachia* « pathogène » identifiée chez *D. melanogaster* (*wMelPop*) qui entraîne la dégénérescence des tissus hôtes en proliférant chez l’adulte et une sévère réduction de son espérance de vie (McGraw *et al.* 2002 ; Min et Benzer 1997). Des effets parasitaires moins marqués ont été montrés chez certains hôtes hébergeant d’autres souches de *Wolbachia*, notamment sur la reproduction avec une réduction de la fécondité (Fytrou *et al.* 2006 ; Lachat 2009). Certaines souches de *Wolbachia* entraînent au contraire une augmentation de la survie ou de la fécondité de leur hôte (Dobson *et al.* 2004 ; Fry *et al.* 2004 ; Vavre *et al.* 1999) ou permettent à certains insectes phytophages de

manipuler la physiologie des plantes (Barr *et al.* 2010 ; Kaiser *et al.* 2010). Un phénotype particulier caractérise la souche *wAtab3* infestant l'hyménoptère parasitoïde *Asobara tabida*, chez qui *Wolbachia* est indispensable à la réalisation de l'ovogenèse (Dedeine *et al.* 2001, 2005). Alors que l'on retrouve encore dans la nature des populations d'*A. tabida* non infectées, ce cas illustre une transition d'une symbiose facultative vers une symbiose obligatoire. Enfin, des relations mutualistes ont été clairement démontrées chez les nématodes filaires (Hoerauf *et al.* 1999 ; Taylor *et al.* 2005) ainsi que chez la punaise de lit *Cimex lectularius* (Hosokawa *et al.* 2010), les *Wolbachia* étant dans ces deux cas indispensables au développement de leur hôte.

2.2.2 Impacts de *Wolbachia* sur l'immunocompétence de ses hôtes

Depuis peu, il a été mis en évidence que *Wolbachia* possède également la capacité de modifier l'immunocompétence de son hôte en la diminuant ou en l'augmentant (Saridaki et Bourtzis 2010). L'une des premières mises en évidence d'un impact de *Wolbachia* sur l'immunocompétence a été une diminution chez *D. simulans* de la capacité d'encapsulation d'œufs de parasitoïdes pondus par la guêpe *Leptopilina heterotoma* (Fytrou *et al.* 2006). Plus récemment, il a été montré que des *Wolbachia* de *D. melanogaster* pouvaient avoir un effet positif sur la capacité de résistance à des virus, augmentant ainsi la survie des drosophiles (Hedges *et al.* 2008 ; Teixeira *et al.* 2008). Des effets identiques ont été mis en évidence chez le moustique *Aedes aegypti* chez qui le transfert de la souche virulente de *Wolbachia* *wMelPop* confère la capacité de résister aux virus de la dengue et du chikungunya mais aussi au protozoaire *Plasmodium* (Glaser et Meola 2010 ; Moreira *et al.* 2009).

A l'heure actuelle, les mécanismes entraînant ces phénomènes de diminution ou d'augmentation de l'immunocompétence n'ont pas encore été élucidés. Toutefois, des modifications d'expression de gènes liés à l'immunité ont été mises en évidence en présence de *Wolbachia* au sein d'une lignée cellulaire de *D. melanogaster* (Xi *et al.* 2008). D'autre part, il a été montré que *Wolbachia* pouvait interférer avec les voies

de détoxification d'espèces réactives impliquées dans le stress oxydant. En effet, la présence de *Wolbachia* dans une lignée cellulaire de moustique infectée est corrélée à une production plus importante de protéines de détoxification (Brennan *et al.* 2008). Il n'est cependant pas démontré si cette surproduction a un effet bénéfique sur l'immunocompétence en évitant des phénomènes d'auto-immunité générés par une production plus importante d'espèces réactives de l'oxygène (renforcement du stress oxydant vis-à-vis des agents pathogènes) ou un effet délétère en détoxifiant les espèces réactives rendant cette réponse immunitaire moins performante.

Cette perturbation de l'immunocompétence, mise en évidence chez les insectes, a également été observée chez une espèce de crustacé terrestre, l'isopode *Armadillidium vulgare*. En effet, les femelles infectées par *Wolbachia* présentent un THC moins important que des femelles non infectées du même âge (Braquart-Varnier *et al.* 2008). De plus, cette chute est corrélée à une augmentation de la septicémie naturelle de l'hémolymph (caractéristique des crustacés) et à une diminution de l'espérance de vie des individus (Braquart-Varnier *et al.* 2008). Toutefois, la perturbation que l'on observe au niveau de ces paramètres varie selon la souche de *Wolbachia* infectant *A. vulgare*. En effet, chez *A. vulgare*, deux souches de *Wolbachia* ont été identifiées : *wVulC* et *wVulM* (Cordaux *et al.* 2004). Ces deux souches féminisantes présentent des capacités de transmission légèrement différentes : *wVulC* possède un taux de transmission plus important que *wVulM* (respectivement 82% et 73%) (Cordaux *et al.* 2004). Ces différences se retrouvent au niveau de l'immunocompétence des hôtes infectés : alors que *wVulC* occasionne une chute du THC, une augmentation de la septicémie naturelle et une baisse de la survie, *wVulM* entraîne uniquement une chute du THC, chute qui est moins importante que celle provoquée par *wVulC*. Plus récemment, *wVulP* (souche recombinante entre *wVulC* et *wVulM*), a été identifiée chez *A. vulgare* (Verne *et al.* 2007). Cette souche posséderait un taux de multiplication dans l'hôte plus élevé que les précédentes (Le Clec'h 2009) mais son impact sur l'immunocompétence n'a pas encore été étudié. Par ailleurs, l'absence d'une stricte

co-évolution entre les souches *wVulC* et *wVulM* et ses hôtes (Cordaux *et al.* 2004) ainsi que la recombinaison à l'origine de *wVulP* (Verne *et al.* 2007) suggèrent l'occurrence de transferts horizontaux intraspécifiques bien qu'actuellement aucun cas d'infection multiple chez les crustacés isopodes n'a été reporté dans la littérature.

L'impact de la présence de *Wolbachia* sur le THC et la septicémie d'*A. vulgare*, impact modulé en fonction des souches, soulèvent ainsi la question des interactions entre *Wolbachia* et le système immunitaire de son hôte.

2.2.3 Relations entre *Wolbachia* et l'immunité d'*A. vulgare*

Plusieurs éléments issus de la littérature et des travaux du laboratoire ont mis en évidence des interactions entre *Wolbachia* et le système immunitaire d'*A. vulgare*.

La présence de *Wolbachia* a été observée dans différents tissus : au sein des gonades, où la concentration de la bactérie est la plus forte, du système nerveux (ganglion cérébroïde, chaîne nerveuse), des muscles et du tissu adipeux (Rigaud *et al.* 1991) mais aussi et de façon inattendue dans les hémocytes (Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Rigaud *et al.* 1991). La colonisation des effecteurs principaux du système immunitaire suggère fortement que les relations entre la bactérie et le système immunitaire de son hôte sont très étroites. Par ailleurs, la réalisation de transferts horizontaux intraspécifiques et interspécifiques de *Wolbachia* a permis de tester l'étendue de la spécialisation de l'hôte. Ainsi la souche *wVulC* injectée à un mâle *A. vulgare* non infecté colonise l'ensemble des tissus (Rigaud et Juchault 1995). Le filtre de compatibilité est donc ouvert et un dialogue moléculaire s'établit au sein de l'individu receveur permettant l'installation de la bactérie. En revanche, les transferts horizontaux de *wVulC* chez des espèces phylogénétiquement plus ou moins proches d'*A. vulgare* ont révélé que plus l'espèce était éloignée, plus la bactérie avait des difficultés à se maintenir dans l'hôte nouvellement infecté (Bouchon *et al.* 1998 ; Moret *et al.* 2001 ; Rigaud *et al.* 2001). Ainsi, les résultats obtenus ont mis en évidence deux cas extrêmes dans lequel le filtre de compatibilité est fermé : un premier

cas chez *Armadillo officinalis* où *Wolbachia* est totalement éliminée, et un second cas chez *Porcellio dilatatus dilatatus* où la bactérie entraîne une mort prématurée de l'hôte (Bouchon *et al.* 1998).

Les modalités permettant la réussite ou entraînant l'échec de l'installation et de la persistance de *Wolbachia* chez son nouvel hôte ne sont pas connues. Cependant, il apparaît nécessaire pour la bactérie d'éviter le système immunitaire de l'hôte pour ne pas être éliminée ou, inversement, que le système immunitaire tolère la bactérie et permette son installation. Dans le but de répondre à ces questions, des travaux pionniers ont été entrepris au cours de la thèse de Juline Herbinière (2005) afin de caractériser le système immunitaire d'*A. vulgare*. Au cours de ce travail, *Wolbachia* a notamment été observée par microscopie électronique à transmission au sein des organes hématopoïétiques et des hémocytes d'*A. vulgare*, à l'intérieur de vacuoles protectrices. Cette observation a soulevé de nouvelles questions : (i) comment *Wolbachia* persiste-t-elle dans les hémocytes ? (ii) Quelles sont les conséquences de la présence de *Wolbachia* sur le système immunitaire d'*A. vulgare* ?

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse au cours desquels j'ai étudié les conséquences de la présence de *Wolbachia* sur le système immunitaire et l'immunocompétence d'*A. vulgare*. Ce travail s'est orienté selon trois axes principaux :

- l'impact de la symbiose à *Wolbachia* sur les hémocytes, effecteurs principaux du système immunitaire d'*A. vulgare*,
- les conséquences de la symbiose à *Wolbachia* sur l'immunocompétence d'*A. vulgare*,
- l'effet de la symbiose à *Wolbachia* sur l'expression de gènes de l'immunité.

Troisième partie

Résultats

Les perturbations engendrées par la présence de *Wolbachia* sur l'immunocompétence de ses hôtes ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, que ce soit chez les insectes (Fytrou *et al.* 2006 ; Glaser et Meola 2010 ; Hedges *et al.* 2008 ; Moreira *et al.* 2009 ; Teixeira *et al.* 2008) comme chez les crustacés isopodes terrestres (Braquart-Varnier *et al.* 2008 ; Rigaud *et al.* 1991). L'intérêt pour ce phénomène s'est accru lorsqu'il a été mis en évidence que cet effet pouvait être utilisé pour lutter contre les virus véhiculés par les arthropodes (Glaser et Meola 2010 ; Hedges *et al.* 2008 ; Moreira *et al.* 2009 ; Teixeira *et al.* 2008 ; Thomas *et al.* 2011). En effet, la présence de *Wolbachia* peut augmenter la résistance de ses hôtes vis-à-vis d'agents pathogènes humains probablement en stimulant leur système immunitaire (Bian *et al.* 2010 ; Glaser et Meola 2010 ; Kambris *et al.* 2010 ; Moreira *et al.* 2009). Cependant, les mécanismes impliqués dans les interactions entre la bactérie et le système immunitaire des hôtes à l'origine de cette protection ne sont pas encore connus. Chez *A. vulgare*, la présence de *Wolbachia* au sein même des cellules immunitaires suggère une interaction intime entre *Wolbachia* et les cellules immunitaires. L'ensemble de ces observations fait du modèle *A. vulgare*/*Wolbachia* un modèle particulièrement pertinent pour étudier l'impact de la bactérie sur les effecteurs du système immunitaire et sur l'immunocompétence de son hôte.

Ainsi au cours de ce travail, nous avons complété la caractérisation du système immunitaire d'*A. vulgare* initiée par les travaux de thèse de Juline Herbinière (2005). Pour cela, nous avons mis en place de nouveaux outils tels que la cytométrie en flux. Ces outils nous ont notamment permis de préciser l'impact de *Wolbachia* sur les cellules du système immunitaire. Par ailleurs, nous avons développé l'étude de nouveaux paramètres immunitaires, comme l'activité PO ou la réponse à différents agents pathogènes qui nous a permis de mesurer l'impact global de la symbiose à *Wolbachia* sur l'immunocompétence de son hôte. Enfin, nous avons exploité les données générées par des banques d'ADNc réalisées dans le cadre de l'ANR EndoSymbArt. Ces données sont issues des banques soustractives réalisées entre ovaires d'animaux

symbiotiques et asymbiotiques ainsi qu'entre animaux entiers asymbiotiques non infectés et infectés par *Salmonella* et une banque d'ADNc normalisée construite à partir d'ARN d'un ensemble de tissus comprenant le système immunitaire (hémocytes et organes hématopoïétiques). L'identification des gènes de l'immunité par cette approche transcriptomique nous a permis d'aborder l'impact de la présence de *Wolbachia* sur l'expression de ces gènes.

Chapitre 1

Impact de la symbiose à *Wolbachia* sur le système immunitaire d'*A.* *vulgare*

1 *Wolbachia* et le système immunitaire

Bien que de nombreuses connaissances ont été acquises sur le système immunitaire des crustacés, celles-ci proviennent presque exclusivement de l'étude des décapodes d'intérêt économique (écrevisses, crevettes, etc.), le système immunitaire des isopodes restant ainsi très peu connu (Coutant 1977 ; Herbinière *et al.* 2005, 2008 ; Jaenicke *et al.* 2009 ; Roth et Kurtz 2009). Cette méconnaissance a été en partie comblée par la caractérisation du système immunitaire d'*A. vulgare* initiée par le travail de thèse de Juline Herbinière (2005). Une approche cytologique en microscopie électronique a permis d'identifier trois types d'effecteurs cellulaires auxquels certaines fonctions ont pu être attribuées : les hémocytes hyalins impliqués dans la phagocytose, les hémocytes semi-granulaires impliqués dans l'encapsulement et secondairement dans la phagocytose et les hémocytes granulaires impliqués dans l'encapsulement et dans la mise en place de cascades immunitaires telles que la cas-

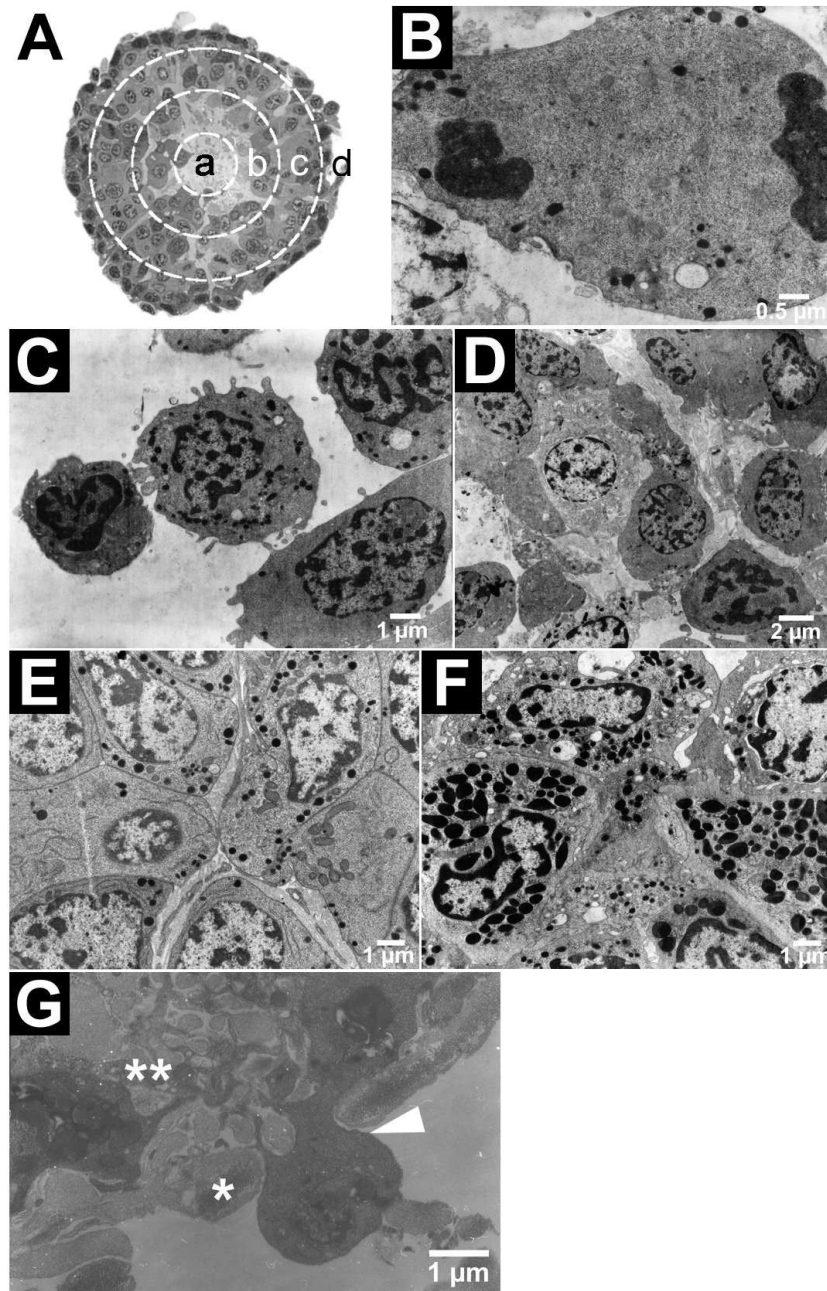


FIGURE III-1 – Structures des organes hématopoïétiques d'*A. vulgare*. Au sein d'un organe hématopoïétique (A, coupe transversale avec un schéma des différentes parties), la compacité du tissu et la morphologie des cellules permettent de distinguer la zone centrale (a, non visible ici, cf. Figure III-2), le cortex interne (b), central (c) et externe (d). La zone centrale contient des cellules souches (en division, B) isolées et prises dans une matrice (C, D). Les granules apparaissent chez les hémocytes du cortex central mais les types granulaires ne peuvent pas être distingués (E). Le cortex externe contient une grande proportion de cellules avec granules (F). Une figure de diapédèse (tête de flèche) au travers de la membrane basale (*) indique un mécanisme probable de départ des hémocytes du cortex externe (**) vers l'hémolymphe (G) (Chevalier *et al.* 2011).

cade PO. Ces trois types hémocytaires sont produits indifféremment par trois paires d'organes hématopoïétiques dont la structure classique a pu être détaillée (Figure III-1) : la zone centrale qui contient les cellules souches, les cortex interne et central où s'effectue la maturation des hémocytes et le cortex externe contenant les hémocytes matures prêts à rejoindre la circulation générale (Coutant 1977).

Chez les animaux infectés, il n'existe aucune différence dans les types cellulaires ou la morphologie des organes hématopoïétiques. *Wolbachia*, observée en microscopie électronique, apparaît présente dans 2 des 3 types d'hémocytes, les hémocytes granulaires et semi-granulaires, ainsi que dans les cellules des organes hématopoïétiques. Toutes les bactéries ont été observées à l'intérieur de vacuoles sans présenter de signes apparents de dégradation.

Suite à ces travaux, mon premier objectif a été de compléter les observations faites au niveau des organes hématopoïétiques afin de déterminer par quel mécanisme les hémocytes pouvaient quitter ces organes. Nous avons également étudié par hybridation *in situ* fluorescente (*Fluorescent In Situ Hybridization* ou FISH), en collaboration avec Joanne Bertaux, la répartition des *Wolbachia* au sein des hémocytes et des organes hématopoïétiques. Enfin, j'ai quantifié les populations hémocytaires par cytométrie en flux, méthodologie que j'ai mise en place au laboratoire en l'adaptant à notre modèle d'étude. L'ensemble de ce travail a ainsi donné lieu à une publication, « The immune cellular effectors of terrestrial isopod *A. vulgare* : Meeting with their invaders, *Wolbachia* », paru dans PLoS One en avril 2011. Ci-dessous sont exposés les résultats majeurs obtenus, associés à d'autres études complémentaires encore en cours.

1.1 Organes hématopoïétiques et libération des hémocytes

La poursuite de l'étude des organes hématopoïétiques d'*A. vulgare* a permis d'observer en microscopie électronique à transmission un mécanisme probable de libération des hémocytes : la diapédèse (Figure III-1G). Ce phénomène se traduit

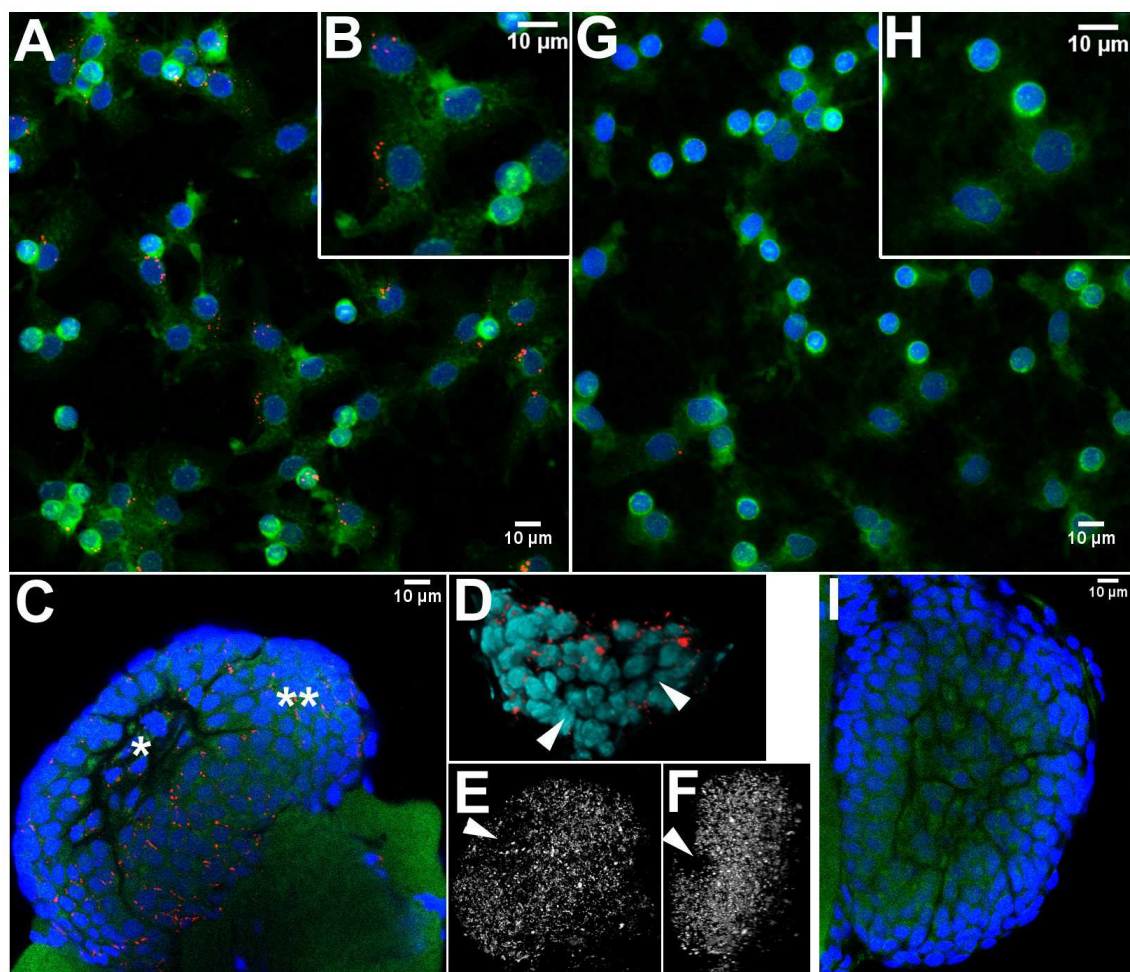


FIGURE III-2 – Détection de *Wolbachia* par FISH dans les hémocytes circulants et les organes hématopoïétiques. Dans les animaux infectés, *Wolbachia* (en rouge) colonise de nombreux hémocytes (A, B) ainsi que la zone centrale (*) et le cortex (**) des organes hématopoïétiques (C) bien que des groupes de cellules restent non-colonisés (têtes de flèche, D-F). Les animaux asymbiotiques contrôles présentent de rares artefacts de signaux (hémocytes G-H, organe hématopoïétique, I). A-C, G-H : rouge : *Wolbachia*, vert : actine, bleu : noyau. A, B, G, H : intensité moyenne des projections en Z. B et H : grossissement. D-F : analyse 3D (ImageJ 3D viewer) de l'image C. D : rendu volumique de *Wolbachia* (rouge) et des noyaux (turquoise) dans la zone centrale extraite de l'empilement des images selon l'axe Z. E et F : rendu volumique des *Wolbachia* (échelle de gris) d'un organe hématopoïétique entier. E : vue frontale correspondant à l'image C, F : vue à 180° (Chevalier *et al.* 2011).

par le passage d’une cellule d’un compartiment de l’organisme à un autre *via* la dégradation partielle des jonctions cellulaires ou de la matrice extracellulaire (Friedl et Weigelin 2008). Dans notre cas, des hémocytes ont été observés traversant la lame basale des organes hématopoïétiques, probablement en dégradant cette dernière. Un tel phénomène de diapédèse a été observé au niveau des organes hématopoïétiques de la crevette *Sicyonia ingentis* chez qui les hémocytes rejoignent la circulation générale en traversant l’endothélium des vaisseaux parcourant ces organes (Martin *et al.* 1987). Toutefois, il s’agit à notre connaissance de la première observation de ce type de phénomène chez les isopodes.

Une fois les hémocytes libérés, ces derniers semblent rejoindre la circulation générale de façon indépendante. En effet, aucune structure particulière au niveau des abords directs des organes hématopoïétiques, suggérant une conduite des hémocytes en un lieu particulier, n’a été observée.

1.2 Quantification de *Wolbachia* dans les cellules du système immunitaire

La présence de *Wolbachia* au sein des organes hématopoïétiques ainsi que des hémocytes a été confirmée en FISH (Figure III-2). Cette approche a également permis d’établir de manière claire la viabilité des bactéries au sein de ces cellules, puisque la sonde utilisée pour localiser *Wolbachia* cible l’ARN 16S de la bactérie, mettant ainsi en évidence une activité transcriptionnelle (Figure III-2). De plus, cette méthode a permis d’estimer le taux d’infection des hémocytes à 38 % et de dénombrer de 1 à 24 bactéries par hémocyte, soit en moyenne 6 bactéries par cellule. Actuellement, l’absence de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires ne permet pas de confirmer la présence des bactéries uniquement dans les hémocytes semi-granulaires et granulaires.

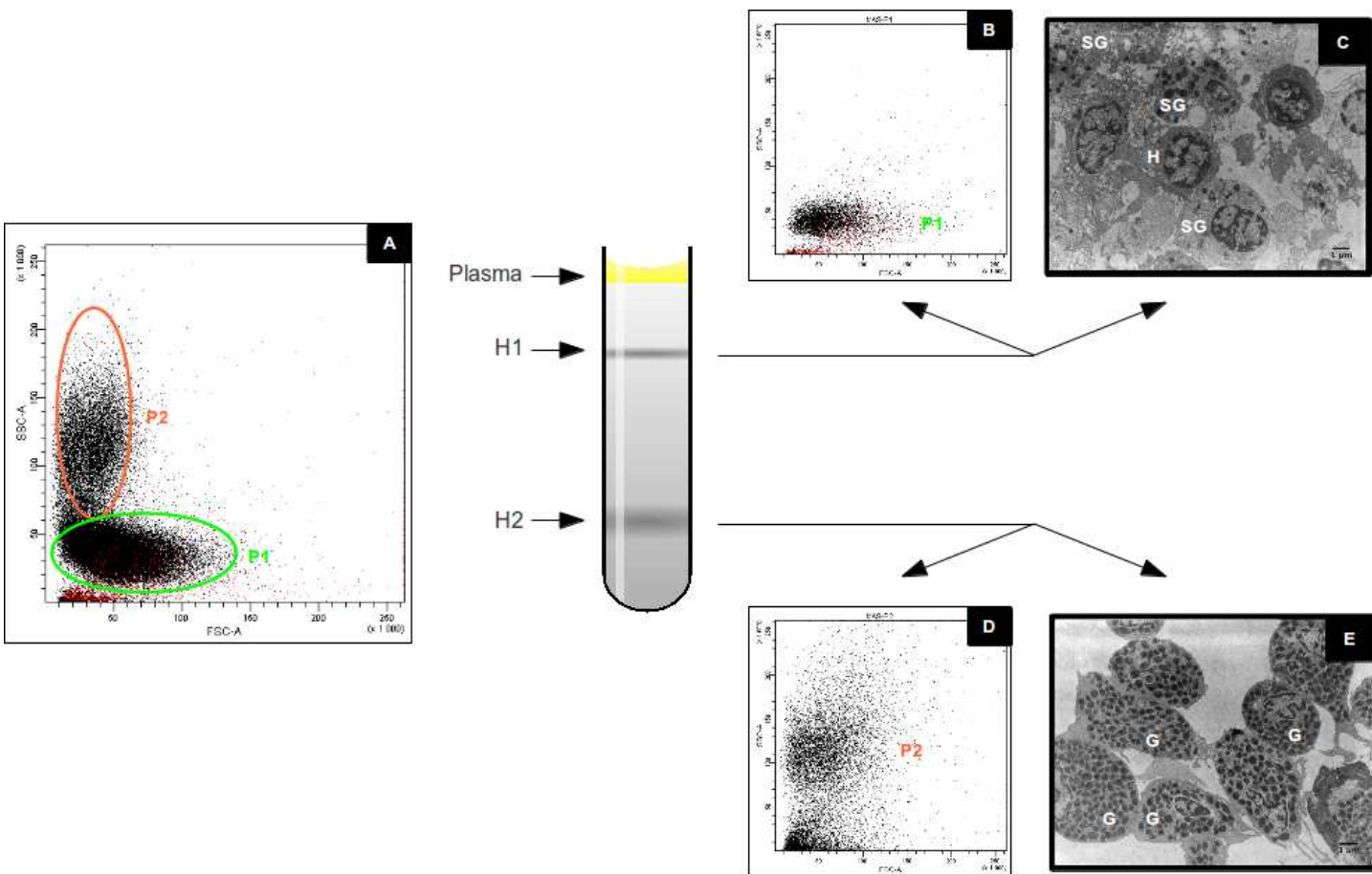


FIGURE III-3 – Profil des populations hémycytaires d'*A. vulgare*. Analyse en cytométrie en flux de l'hémolymphe montrant deux populations P1 (vert) et P2 (orange) **A**. Ces deux populations peuvent être séparées sur gradient de Percoll en population H1 et H2. H1 correspondant à la population P1 (**B**) et contient des hémycytes semi-granulaires et peu d'hémycytes hyalins (**C**). H2 correspondant à la population P2 (**D**) et contient uniquement des hémycytes granulaires (**E**). Analyse en cytométrie en flux, points noirs : cellules viables, points rouges : cellules nécrotiques, cercle P1 et P2 dessinés manuellement. En MET, H : hémycyte hyalin, SG : hémycyte semi-granulaire, G : hémycyte granulaire.

Concernant les organes hématopoïétiques, la présence des *Wolbachia* y a également été confirmée. Là encore, le taux d'infection s'avère relativement élevé avec un total d'environ 7.10^3 bactéries dans un seul organe. Toutefois, l'infection des organes ne semble pas homogène puisqu'on observe chez certains d'entre eux des aires regroupant des cellules dépourvues de bactéries (Figure III-2C et III-2E).

1.3 Impact de la présence de *Wolbachia* sur les proportions hémocytaires

1.3.1 Cytométrie en flux

Afin d'effectuer l'étude comparative des systèmes immunitaires d'animaux non infectés et infectés par *Wolbachia*, nous avons adapté à notre modèle la technique de cytométrie en flux. Cette approche apparaît pertinente pour ce type d'étude puisqu'elle permet l'analyse d'un grand nombre de cellules en un temps réduit autorisant ainsi un nombre important d'échantillons.

Pour adapter cette technique aux isopodes, un certain nombre de mises au point a été nécessaire. La première étape clé de ce processus a été de déterminer une solution de survie permettant de maintenir de manière intègre les hémocytes *ex vivo*, sur une période relativement longue (85 % de survie cellulaire après 15 heures), afin de pouvoir les manipuler. Suite au test de différentes solutions, à savoir le MAS (*Modified Alsever's Solution*, anticoagulant), le PBS, le PBS+Glucose (PBS ajusté avec du glucose à 750 mOsm, osmolarité similaire à celle du milieu interne d'*A. vulgare*), seul le PBS+Glucose s'est montré apte à maintenir les hémocytes en vie assez longtemps. La seconde mise au point a été la caractérisation des hémocytes en cytométrie en flux selon deux paramètres, la taille des cellules donnée par le *Foward Scatter* (FSC) et leur complexité interne donnée par le *Side Scatter* (SSC). Ces critères appliqués à l'analyse de l'hémolymphe d'*A. vulgare* nous ont permis d'identifier deux populations de cellules : P1 et P2 (Figure III-3). Afin de connaître

les types hématocytaires présents dans chacune de ces populations, une séparation des hémocytes sur gradient de Percoll[®] a été réalisée. Après de très nombreux essais, un gradient continu à 55 % de Percoll[®] a permis d'obtenir deux bandes cellulaires : H1 correspondant à P1 et H2 correspondant à P2 (Figures III-3B et III-3D). L'analyse en microscopie électronique à transmission de ces deux fractions a permis d'associer les différents types cellulaires à chaque population : ainsi P1 comprend les hémocytes hyalins et semi-granulaires et P2 comprend uniquement les hémocytes granulaires (Figures III-3E et III-3F).

La première application de la cytométrie en flux a consisté à comparer la proportion de ces deux populations P1 et P2 entre animaux non infectés et infectés par *Wolbachia*. Cette comparaison a révélé que les animaux symbiotiques présentent une proportion plus faible d'hémocytes granulaires (P2) (11,76 %) comparativement aux animaux asymbiotiques (18,26 %). La diminution du nombre d'hémocytes circulants précédemment décrite chez les animaux symbiotiques (Braquart-Varnier *et al.* 2008) a été observée chez des animaux âgés de 2 ans. Dans notre étude, les animaux étaient âgés de un an et aucune différence dans le THC entre les animaux infectés ou non par *Wolbachia* n'a été observée. De ce fait, nos résultats montrent que dès un an, la présence de *Wolbachia* influe sur le système immunitaire de son hôte en modifiant les proportions des types cellulaires.

Cette perturbation de la proportion des hémocytes granulaires pourrait modifier directement la capacité des individus infectés à se défendre vis-à-vis d'agents pathogènes en affectant l'activité PO. En effet, les hémocytes granulaires sont potentiellement responsables de cette activité comme cela a été démontré chez l'écrevisse *P. leniusculus* (Johansson *et al.* 2000 ; Sricharoen *et al.* 2005). Cette activité PO étant essentielle dans la défense immunitaire des Invertébrés (Cerenius et Söderhäll 2004 ; Cerenius *et al.* 2008, 2010b), elle a fait l'objet d'une étude rapportée dans le chapitre 2 de cette partie.

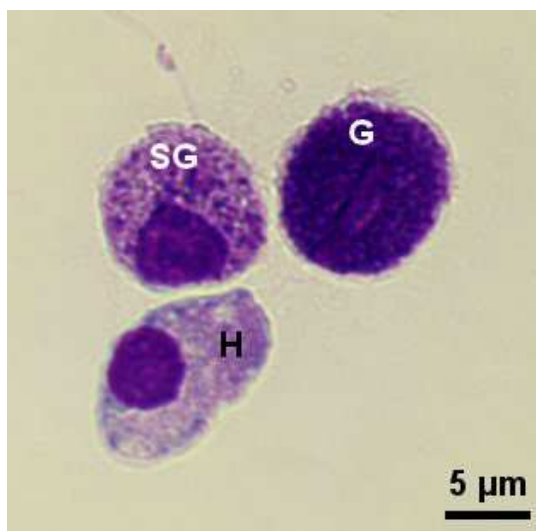


FIGURE III-4 – Observation des trois types hémocytaires d'*A. vulgare* après cytocentrifugation sur lame et coloration Hemacolor®. La coloration permet de distinguer les hémocytes hyalins (H), les hémocytes semi-granulaires (SG) et les hémocytes granulaires (G).

1.3.2 Cytocentrifugation ¹

La cytométrie en flux ne permet pas de distinguer les hémocytes hyalins des hémocytes semi-granulaires. Nous avons alors adopté une autre approche, la centrifugation de cellules sur lame ou cytocentrifugation, afin de déterminer si la proportion de ces deux autres types hémocytaires était elle aussi perturbée en présence de *Wolbachia*. Cette technique permet d'étaler sur lame, suite à une centrifugation, des cellules en suspension dans un tampon. Les cellules ainsi étalées peuvent ensuite être colorées afin de distinguer chaque type cellulaire, ce qui permet de quantifier leur proportion respective.

La cytocentrifugation couplée à une coloration Hemacolor® nous permet de distinguer les trois types hémocytaires (Figure III-4). Cette distinction se base principalement sur la coloration des granules et des noyaux. Ainsi les granules des hémocytes granulaires apparaissent en violet foncé masquant les noyaux des cellules, ceux des hémocytes semi-granulaires en violet plus clair laissant apparaître un noyau

1. Les résultats concernant la cytocentrifugation ont été obtenus au cours du stage de Romain Pigeault, étudiant en 3^e année de Licence Écologie et Biologie des Organismes, que j'ai co-encadré avec Christine Braquart-Varnier.

de couleur violet et enfin le cytoplasme des hémocytes hyalins apparaît en rose avec un noyau de couleur violet. A l'heure actuelle, la coloration des hémocytes semi-granulaires n'est pas optimale et il est parfois difficile de les distinguer des hémocytes hyalins. L'adaptation de certaines étapes du protocole, comme le tampon de suspension (MAS), la concentration des colorants ou le temps de coloration, seront nécessaires afin d'obtenir une méthode fiable permettant la distinction sans équivoque de ces trois types cellulaires. Les premiers résultats obtenus sont actuellement utilisés pour optimiser les différents paramètres que nous appliquerons pour les quantifications des proportions hémocytaires à l'aide du logiciel ImageJ, à savoir l'optimisation de la prise d'image ainsi que la procédure automatique de comptage des différents types hémocytaires.

2 Conclusion et perspectives

Le travail ainsi réalisé par Juline Herbinière, Joanne Bertaux et moi-même a permis en premier lieu de caractériser les différents types hémocytaires et certaines de leurs fonctions ainsi que les organes hématopoïétiques dont ils sont issus. Le phénomène particulier de diapédèse, rarement décrit, a également été observé, permettant ainsi d'établir le mécanisme probable par lequel les hémocytes d'*A. vulgare* sont libérés dans la circulation. L'observation en FISH d'hémocytes d'animaux infectés a mis en évidence la présence de *Wolbachia* au sein des cellules du système immunitaire, c'est-à-dire hémocytes et organes hématopoïétiques, de confirmer sans ambiguïté leur viabilité et d'estimer le taux d'infection des hémocytes. Enfin, la mise en place de la cytométrie en flux a permis de quantifier une chute de la proportion d'hémocytes granulaires chez les animaux infectés par *Wolbachia*.

La poursuite de ce travail se déroulera selon deux orientations. La première sera de quantifier la proportion d'hémocytes granulaires chez des animaux symbiotiques

et asymbiotiques âgés de deux ans afin d'observer l'évolution des proportions de cette population au cours du vieillissement en présence ou en absence de la bactérie. Ceci nous permettra d'observer l'impact de *Wolbachia* sur les cellules du système immunitaire à long terme, notamment chez des animaux de deux ans dont le THC est plus faible que celui d'animaux non infectés. Le second axe consistera à développer des marqueurs cellulaires fluorescents spécifiques des trois types d'hémocytes compatibles avec la FISH. Ces marqueurs, couplés à des techniques telles que l'utilisation de billes de latex ou de Sephadex[®] ou de bactéries fluorescentes, seront fondamentaux pour quantifier des caractéristiques de chaque type hémocytaire (phagocytose, étalement, encapsulation). Ces marqueurs, associés à la détection de *Wolbachia* en FISH, permettront également de confirmer l'absence de la bactérie dans les hémocytes hyalins. Si confirmation il y a, deux hypothèses pourraient alors être envisagées pour expliquer cette situation : soit les hémocytes hyalins sont capables de reconnaître et d'éliminer la bactérie, soit la bactérie ne colonise pas les cellules souches ou les cellules en cours de différenciation donnant ce type cellulaire car ces cellules ne possèdent pas de récepteurs permettant l'entrée de la bactérie.

D'autre part, le développement de tels marqueurs cellulaires permettra aussi d'appréhender le lignage des hémocytes au niveau des organes hématopoïétiques, à savoir comment les différents types cellulaires évoluent dans un organe. Ces marqueurs permettront aussi de mieux comprendre l'origine des aires vierges de *Wolbachia* observables en FISH au niveau des organes hématopoïétiques et surtout de savoir si ces phénomènes concernent toujours le même type cellulaire. En effet, ces aires particulières pourraient correspondre à l'émergence de lignées cellulaires dépourvues de bactéries. Cette absence de bactérie pourrait être soit la manifestation là aussi d'une reconnaissance de la bactérie par l'hôte, soit la disparition de récepteurs permettant à la bactérie d'entrer dans les cellules, soit une perte stochastique de la bactérie au gré des divisions.

Par ailleurs, la présence permanente de *Wolbachia* au niveau des organes hématopoïétiques d'animaux symbiotiques a pour conséquence un renouvellement continu d'hémocytes abritant la bactérie. Ceci pourrait conférer deux avantages à *Wolbachia* : elle permettrait à la bactérie, d'une part, de coloniser et de maintenir un taux d'infection de tous les tissus de l'organisme puisque les hémocytes peuvent s'infiltrer partout et, d'autre part, d'être localisée idéalement pour assurer son transfert horizontal. En effet, il a été montré qu'un simple contact hémolymphatique entre animaux symbiotiques et asymbiotiques suffit à transmettre la bactérie (Rigaud et Juchault 1995). Ainsi, lors d'une nouvelle infection, la colonisation des organes hématopoïétiques par *Wolbachia* pourrait être un élément clé dans la colonisation et le maintien de l'infection chez son nouvel hôte, procurant ainsi à la bactérie un avantage incontestable. Une étude en cours sur la dynamique d'infection, par PCR quantitative (qPCR), entre les différents compartiments d'un individu, à savoir les hémocytes, les organes hématopoïétiques, les ovaires (tissu essentiel à la transmission verticale de la bactérie) et la chaîne nerveuse devrait mettre en évidence ce phénomène. Cette dynamique a été réalisée par l'injection de l'hémolymph porteuse de la souche *wVulC* à des individus non infectés par *Wolbachia*.

Enfin, lors d'un transfert horizontal, les mécanismes utilisés par la bactérie pour coloniser les tissus et donc entrer dans les cellules hôtes ne sont pas connus. D'autres bactéries intracellulaires ont la capacité d'induire une endocytose provoquée par une manipulation directe du cytosquelette *via* l'injection de facteurs de virulence au travers d'un système de sécrétion (*Salmonella*, *Shigella*) ou par une interaction de type ligand/récepteur (*Listeria*, *Yersinia*) (Cossart et Sansonetti 2004). L'utilisation de *Wolbachia* marquée (par FITC ou par un kit de type BacLight™ (Rasgon *et al.* 2006)) ainsi qu'un marquage du cytosquelette permettraient de visualiser la dynamique d'infection de la bactérie au niveau de cellules de tissus non phagocytaires et d'établir si *Wolbachia* utilise de tels stratagèmes pour pénétrer dans les cellules saines.

Chapitre 2

Conséquences de la symbiose à *Wolbachia* sur l'immunocompétence d'*A. vulgare*

Plusieurs études récentes chez les drosophiles *D. melanogaster* et *D. simulans* ainsi que chez les moustiques *An. gambiae* et *Ae. aegypti* ont montré que la présence de *Wolbachia* peut diminuer (Fytrou *et al.* 2006) ou augmenter (Bian *et al.* 2010 ; Glaser et Meola 2010 ; Kambris *et al.* 2009, 2010 ; Moreira *et al.* 2009 ; Teixeira *et al.* 2008) l'immunocompétence de ses hôtes.

Chez *A. vulgare*, il a été montré récemment au laboratoire que la présence de *Wolbachia* perturbe le THC (Braquart-Varnier *et al.* 2008). En effet, les femelles infectées par la bactérie présentent moins d'hémocytes circulants à l'âge de deux ans que les femelles asymbiotiques. Ces résultats nous ont conduit à poursuivre cette étude en prenant en compte l'effet de l'âge sur ce paramètre. L'impact de *Wolbachia* et de l'âge sur les compétences immunitaires d'*A. vulgare* a également été estimé sur un paramètre classiquement testé dans ce genre d'étude, à savoir l'activité PO. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans *Naturwissenschaften*, « Variations of immune parameters in terrestrial isopods : a matter of gender, aging

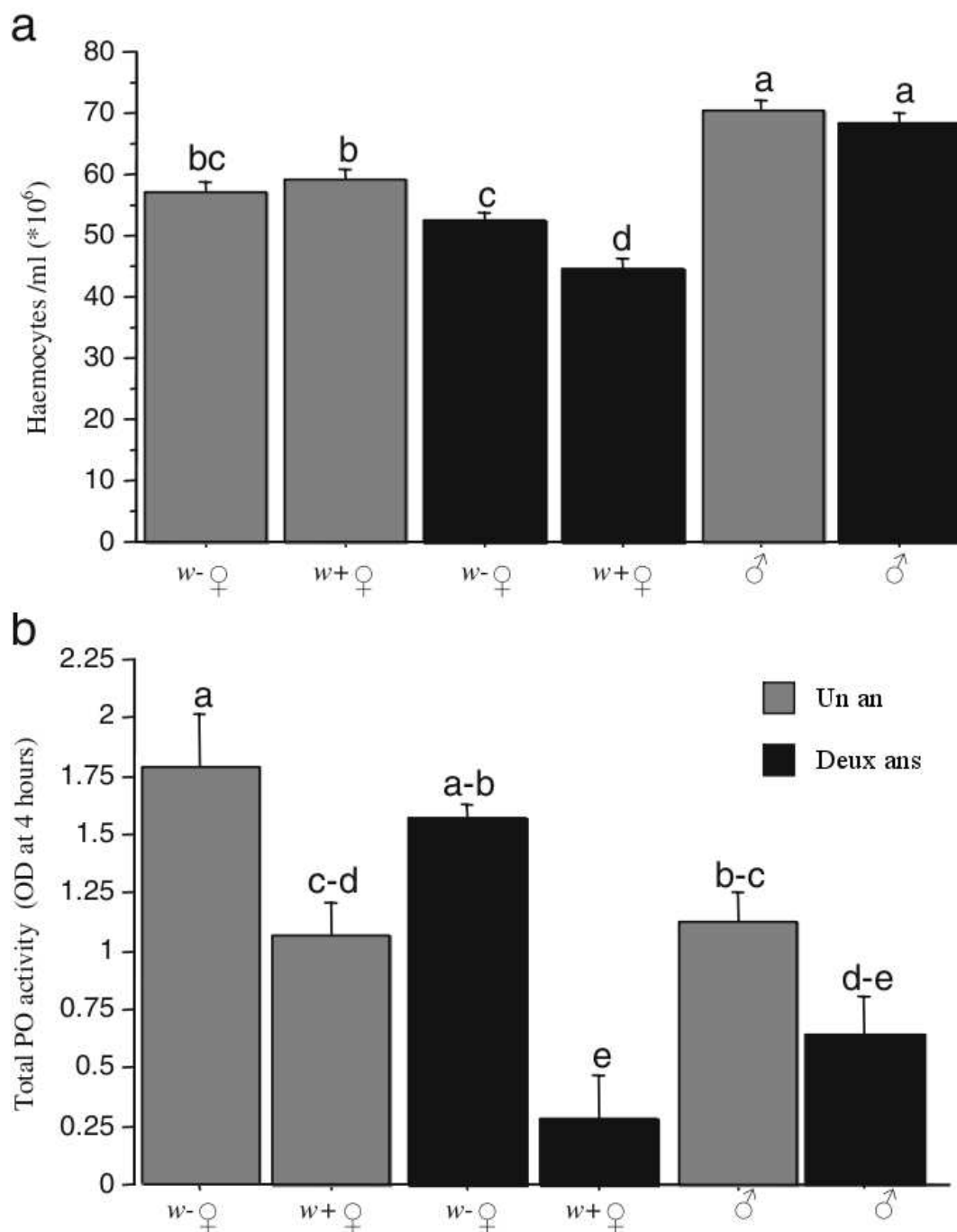


FIGURE III-5 – Variation de la densité hémocytaire (a) et de l'activité PO (b) chez les femelles symbiotiques et asymbiotiques ainsi que chez les mâles à l'âge de un an et deux ans. Les données présentées sont issues d'une transformations Box-Cox. Les niveaux qui ne présentent pas la même lettre sont significativement différents. La barre d'erreur présente l'erreur standard (Sicard *et al.* 2010).

and *Wolbachia* » paru en septembre 2010. Enfin, de façon à estimer le niveau global d'immunocompétence des individus, nous avons mesuré le taux de survie d'individus infectés expérimentalement par des bactéries ou des champignons. Ces paramètres ont été mesurés sur des femelles symbiotiques et asymbiotiques, ainsi que sur des mâles, le plus souvent âgés de un et deux ans. Les résultats obtenus ont ainsi révélé l'importance des facteurs endosymbiote, sexe et âge sur l'immunocompétence d'*A. vulgare*.

1 Impacts de la présence de *Wolbachia* sur les paramètres immunitaires

1.1 Taux d'hémocytes circulants et activité PO

Chez les crustacés, les hémocytes circulants jouent un rôle important dans la défense immunitaire et l'immunocompétence de l'individu (Bauchau 1981 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006 ; Johansson *et al.* 2000). En effet, ils sont indispensables à la réponse cellulaire (phagocytose, encapsulement) ainsi qu'à la réponse humorale (dégranulation de facteurs humoraux).

Chez *A. vulgare*, le THC varie en fonction de la présence de la bactérie, de l'âge et du genre (Figure III-5). En effet, la comparaison du THC entre les femelles asymbiotiques et symbiotiques âgées de deux ans a confirmé le nombre plus faible d'hémocytes circulants chez les femelles symbiotiques sur une autre population d'*A. vulgare* que celle étudiée par Braquart-Varnier *et al.* (2008). En revanche, cette différence n'est pas observée à l'âge de un an (Figure III-5). Cette perturbation ne semble donc pas constante au cours de la vie des femelles. D'autre part, quelque soit le statut symbiotique de l'animal, le THC diminue en fonction de l'âge, cette diminution étant très fortement accentuée en présence de *Wolbachia*. Cette chute due à l'âge est cependant spécifique du sexe puisque les mâles, quant à eux, possèdent

un THC constant au cours de leur vie, environ le double de celui des femelles.

Nous avons poursuivi notre étude de l'influence de *Wolbachia* et de l'âge sur les paramètres immunitaires d'*A. vulgare*, en quantifiant l'activité PO totale, c'est-à-dire celle circulante dans l'hémolymph et celle contenue dans les hémocytes, d'animaux infectés ou non par *Wolbachia* âgés de un et deux ans. Cette activité enzymatique constitue un autre élément majeur de l'immunité des Invertébrés (Cerenius *et al.* 2010b) et particulièrement chez les crustacés (Cerenius *et al.* 2008). Cette activité est impliquée dans l'élimination des bactéries par la production de molécules cytotoxiques (Cerenius *et al.* 2008), dans l'encapsulement (Cerenius *et al.* 2008) et pourrait être impliquée dans l'hématopoïèse (Fagutao *et al.* 2009).

Chez *A. vulgare*, l'activité PO varie en fonction de la présence de la bactérie, de l'âge et du genre (Figure III-5). En effet, cette activité est moins importante chez les femelles symbiotiques que chez les femelles asymbiotiques aussi bien à l'âge de un an qu'à l'âge de deux ans. Au cours du vieillissement, l'activité PO des femelles symbiotiques chute alors que celle des femelles asymbiotiques ne présente pas de différence (avec tout de même une tendance à la baisse). Cette différence au cours de la vie de l'individu se retrouve aussi chez les mâles, les animaux de deux ans ayant une activité PO moins importante que ceux de un an. Les mâles présentent une activité PO plus faible que les femelles quelque soit l'âge des individus.

Ainsi, la présence de *Wolbachia*, l'âge et le sexe des individus modifient le THC et l'activité PO. Dès l'âge de un an, l'activité PO des femelles symbiotiques est inférieure à celle des femelles asymbiotiques alors que leur THC n'est pas différent. Cette diminution d'environ 30 % est identique à celle de la proportion d'hémocytes granulaires chez les femelles symbiotiques du même âge. Cependant, pour établir un lien direct entre ces deux observations, l'implication des hémocytes granulaires dans la mise en place de l'activité PO devra être démontrée. A l'âge de deux ans, la chute de l'activité PO chez les femelles symbiotiques est accentuée (~ 50 %), ce qui pourrait être due au plus faible nombre d'hémocytes circulants chez ces animaux et

particulièrement à une plus faible proportion d'hémocytes granulaires. Cette proportion devra être quantifiée en cytométrie en flux chez des femelles symbiotiques âgées de deux ans. La comparaison entre mâles et femelles asymbiotiques met en évidence, chez les mâles, un THC plus important quelque soit l'âge mais une activité PO plus faible, activité qui diminue avec l'âge (Figure III-5). Cette différence importante du THC et de l'activité PO entre mâles et femelles pourrait s'expliquer par une différence dans la proportion d'hémocytes granulaires, proportion qu'il sera nécessaire là aussi de quantifier.

La variation des paramètres immunitaires au cours du vieillissement des femelles, accentuée en présence de l'endosymbiote, pourrait avoir un impact sur l'immuno-compétence des individus : les femelles symbiotiques pourraient être plus sensibles aux agents pathogènes que les femelles asymbiotiques, d'autant plus s'il s'agit de femelles âgées.

1.2 Phénomènes apoptotiques des cellules immunitaires

La chute du THC en fonction de l'âge et de la présence de *Wolbachia* pourrait s'expliquer selon deux hypothèses. La première concerne la perturbation de l'hématopoïèse qui pourrait être accentuée par la présence de *Wolbachia* en influençant directement l'expression des gènes impliqués dans ce processus. Chez *A. vulgare*, nous avons identifié deux gènes potentiellement impliqués dans l'hématopoïèse : runt et astakine. La quantification de l'expression de ces gènes chez des individus symbiotiques et asymbiotiques sera abordée au cours du chapitre 3 de cette partie.

La seconde hypothèse concerne la perturbation des phénomènes cellulaires, en particulier l'apoptose, qui serait accrue en fonction de l'âge et de la présence de *Wolbachia*. En effet, la bactérie pourrait accentuer l'apoptose des hémocytes soit au niveau des organes hématopoïétiques, durant la maturation des cellules, soit directement au niveau des hémocytes circulants dans l'hémolymphe. L'accumulation de ces phénomènes apoptotiques conduirait au final à un THC plus faible chez les

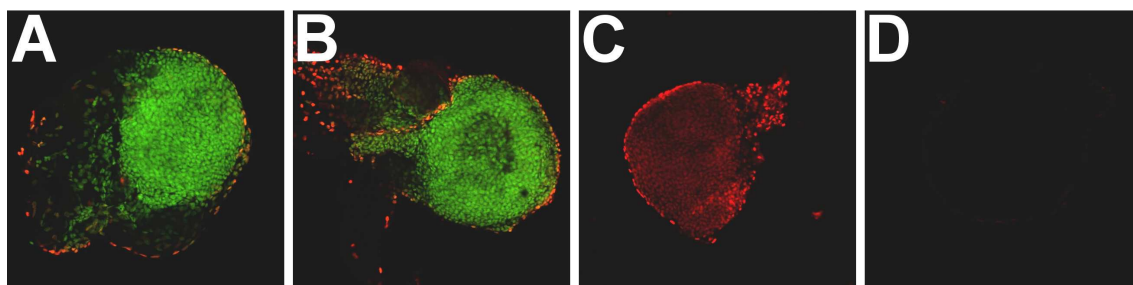


FIGURE III-6 – Marquage TUNEL réalisé sur des organes hématopoïétiques d'*A. vulgare*. Organe hématopoïétique d'un individu asymbiotique (A), d'un individu symbiotique (B), Contrôle positif (C), Contrôle négatif (D), vert : noyaux des cellules saines, rouge : noyaux apoptotiques.

femelles asymbiotiques et symbiotiques âgées de deux ans.

Ainsi, nous avons testé cette dernière hypothèse en quantifiant les phénomènes apoptotiques chez des animaux infectés ou non par *Wolbachia*, à la fois au niveau des organes hématopoïétiques et au niveau des hémocytes.

1.2.1 Organes hématopoïétiques et apoptose

L'apoptose est un phénomène cellulaire très important chez les organismes pluricellulaires. Elle joue un rôle fondamental au cours du développement (structuration de tissus, élimination de cellules endommagées, mue), lors du renouvellement cellulaire ou suite à une infection limitant la propagation des agents pathogènes (Bergmann et Steller 2010 ; Johnson *et al.* 2008). Ce phénomène fait par conséquent appel à des mécanismes très conservés (Menze *et al.* 2010) dont la caractérisation a permis d'établir plusieurs grandes méthodes de détection de figures apoptotiques. La première de ces méthodes consiste à marquer spécifiquement l'étape de fragmentation de l'ADN nucléaire. Ce clivage de l'ADN est révélé par un marquage TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling*) consistant à transférer un dUTP conjugué à un fluorochrome au niveau de l'extrémité des fragments dégradés.

A l'aide de cette méthode, nous avons étudié les phénomènes apoptotiques des organes hématopoïétiques de femelles asymbiotiques et symbiotiques âgées de deux ans. Le protocole expérimental a nécessité une série de mises au point principalement

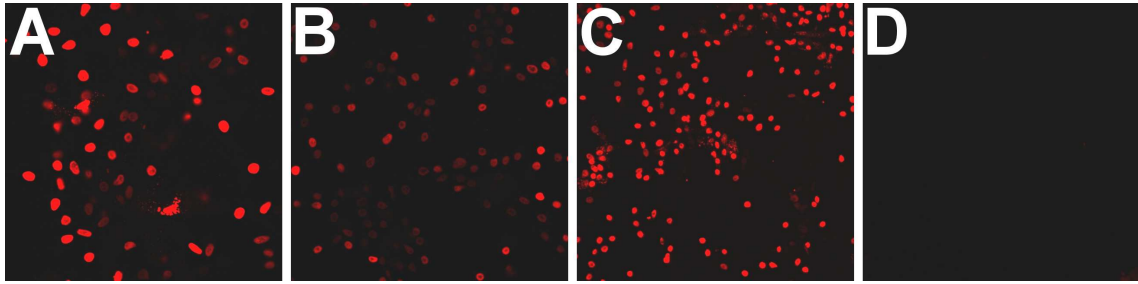


FIGURE III-7 – Marquage TUNEL réalisé sur des hémocytes d'*A. vulgare*. Hémocytes d'un individu asymbiotique (A), d'un individu symbiotique (B), Contrôle positif (C), Contrôle négatif (D), rouge : noyaux apoptotiques.

sur la fixation et la perméabilisation des tissus afin de pallier les problèmes de pénétration des différents réactifs. Ces organes ont ainsi été placés sur lame, fixés et perméabilisés. En parallèle, des contrôles positifs ont été réalisés à l'aide d'un traitement à la DNase simulant la dégradation de l'ADN. Les organes sont ensuite marqués par la réaction TUNEL.

Les résultats de ce marquage n'ont montré aucune différence entre organes hématopoïétiques d'animaux symbiotiques et ceux d'animaux asymbiotiques. Aucun marquage n'a été observé dans les cellules mêmes de l'organe, y compris dans la zone corticale où s'effectue la maturation des hémocytes. Les seuls événements apoptotiques observés ont été localisés au niveau du tissu adipeux entourant les organes (Figures III-6A et III-6B). Les contrôles positifs ont, quant à eux, confirmé le marquage jusqu'au cœur de l'organe (Figure III-6C) et donc la possibilité d'observer les figures apoptotiques, si elles existaient, dans tout l'organe.

1.2.2 Hémocytes et apoptose

Nous avons tenté de quantifier les phénomènes apoptotiques des hémocytes par un marquage TUNEL. Ce marquage s'est cependant révélé inapproprié pour deux raisons. La première était un déclenchement massif et spontané de phénomènes apoptotiques lors de l'expérimentation, probablement dû à une exposition de l'hémolymphes à l'air libre durant 30 minutes (Figure III-7). D'autre part, nous avons remarqué que les capacités d'adhésion des hémocytes d'animaux symbiotiques sem-

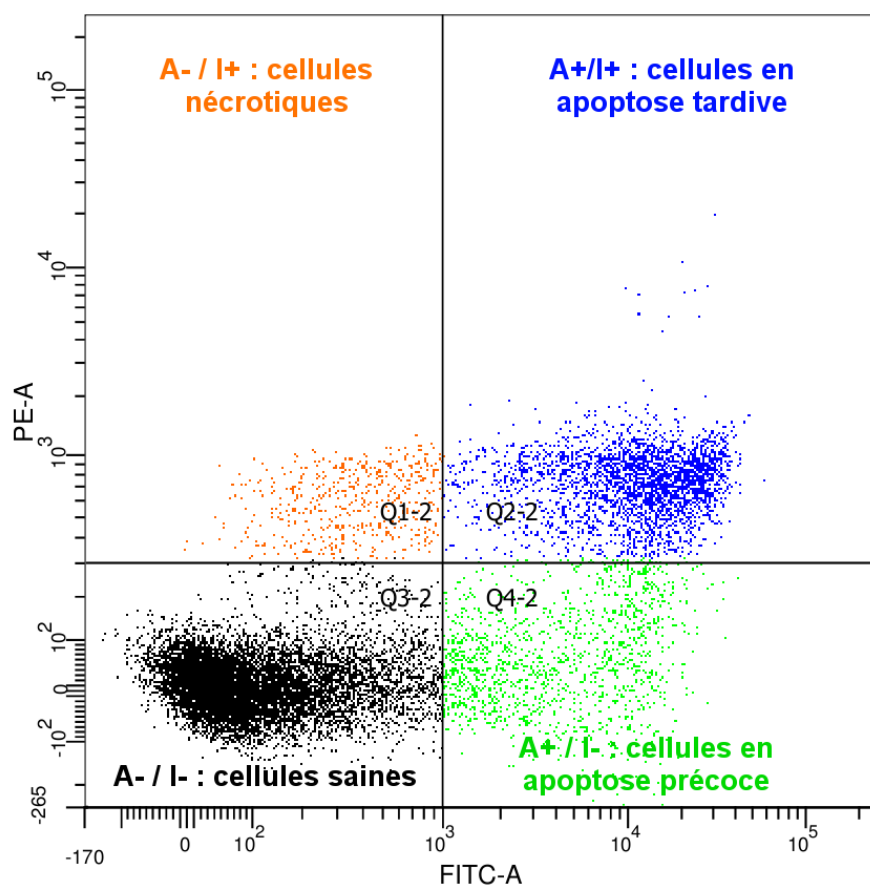


FIGURE III-8 – Fenêtrage type issu du marquage de l'apoptose par Annexine V / Iodure de propidium. Les cellules saines en noir ne sont pas marquées, les cellules en apoptose précoce en vert sont marquées uniquement avec l'Annexine, les cellules en apoptoses tardives en bleu sont marquées avec l'Annexine et l'IP) et les cellules nécrotiques en rouge sont marquées uniquement avec l'IP) – A : Annexine V ; I : Iodure de propidium.

blaient perturbées puisque le nombre de cellules adhérant à la lame de verre expérimentale diminuait au cours de l'expérience, et cela de manière plus prononcée pour les hémocytes d'animaux infectés par *Wolbachia*. Afin de nous affranchir de ces contraintes, nous avons opté pour une approche en cytométrie en flux *via* un marquage Annexine V/Iodure de propidium (IP). Le marquage Annexine constitue la deuxième grande méthode de marquage des phénomènes apoptotiques. Elle est spécifique d'une étape précoce de l'apoptose : la réversion de la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques. Cette réversion conduit à l'exposition à la surface de la cellule des phosphatidylsérines, normalement absentes. L'Annexine V étant un ligand intracellulaire naturel de ces phosphatidylsérines, son utilisation (lorsqu'elle est couplée à un fluorochrome) de façon extracellulaire permet de révéler la présence de phosphatidylsérines à la surface des cellules. L'IP, quant à lui, est un intercalant des acides nucléiques et ne peut pénétrer dans la cellule que lorsque celle-ci présente des pores (lors d'une nécrose par exemple). Afin d'avoir une vision plus précise de l'évolution de ces phénomènes apoptotiques au cours de la vie des animaux, des hémocytes de femelles asymbiotiques et symbiotiques ainsi que de mâles âgés de 8, 12, 15, 18 et 24 mois ont été marqués et analysés en cytométrie en flux.

La mise au point de ce double marquage Annexine V/IP nous a permis de distinguer quatre catégories cellulaires : les cellules saines (aucun marquage), les cellules en apoptose précoce (simple marquage Annexine), les cellules en apoptose tardive (double marquage Annexine/IP) et les cellules nécrotiques (simple marquage IP) (Figure III-8). Les cellules en apoptose tardive présentent des pores sur leur membrane cytoplasmique, contrairement aux cellules en apoptose précoce qui possède encore une membrane intègre.

L'analyse des résultats par régression logistique montre que les proportions des phénomènes apoptotiques sont différentes entre chaque âge, ceci quelque soit le statut symbiotique ($p < 0,001$) (Figures III-9 et III-10). Nous pouvons de plus observer une légère tendance à l'augmentation des phénomènes apoptotiques au cours du

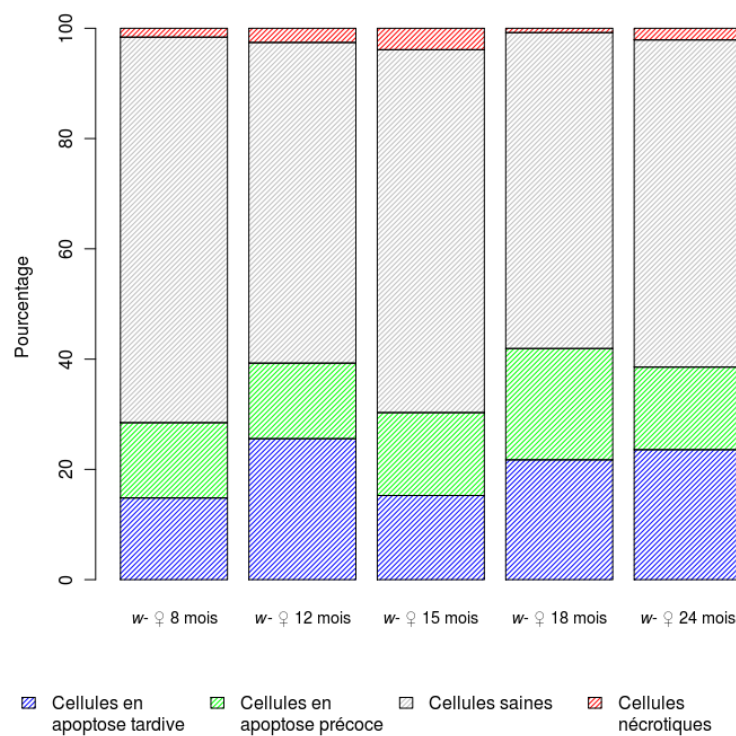


FIGURE III-9 – Proportion des phénomènes apoptotiques des hémocytes de femelles *A. vulgare* asymbiotiques (*w-*) au cours du vieillissement.

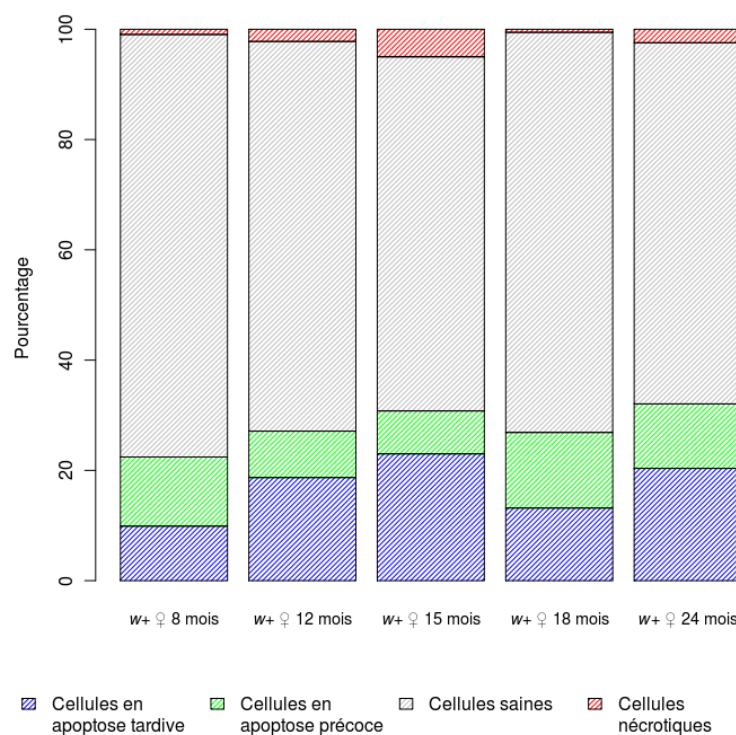


FIGURE III-10 – Proportion des phénomènes apoptotiques des hémocytes de femelles *A. vulgare* symbiotiques (*w+*) au cours du vieillissement.

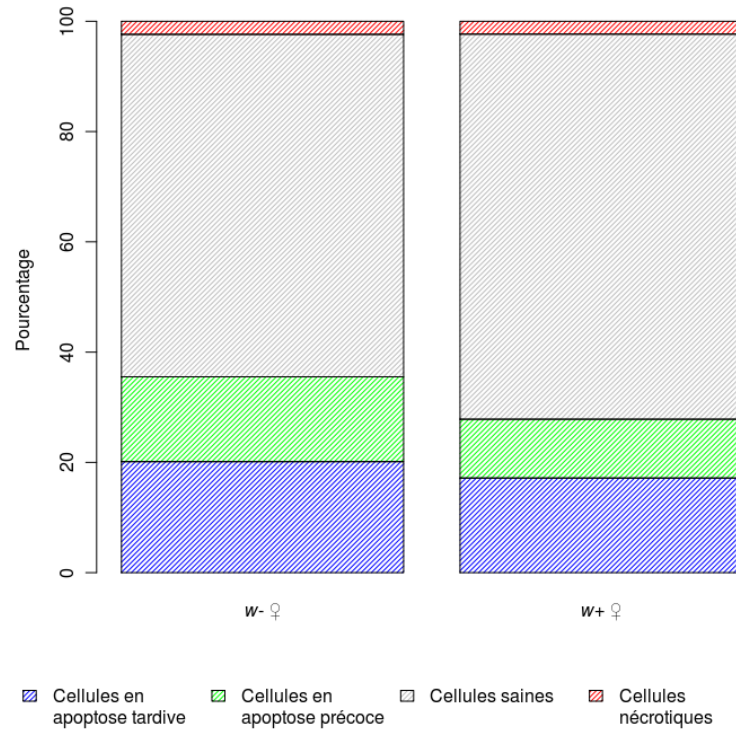


FIGURE III-11 – Proportion des phénomènes apoptotiques des hémocytes de femelles *A. vulgare* asymbiotiques ($w-$) et symbiotiques ($w+$) tout âge confondu.

vieillissement chez les femelles asymbiotiques comme symbiotiques. Par ailleurs, si l'on compare les femelles asymbiotiques aux femelles symbiotiques, une diminution nette de la proportion des phénomènes apoptotiques en présence de *Wolbachia* est observable. Ceci est d'autant plus visible si l'on ne tient plus compte de l'âge (régression logistique, $p < 0,001$) (Figure III-11). La présence de *Wolbachia* induirait donc une baisse de ces phénomènes apoptotiques. Ces résultats montrent aussi que l'apoptose n'est responsable ni de la chute des hémocytes au cours du vieillissement des femelles, la tendance à l'augmentation des phénomènes apoptotiques étant faible, ni du plus faible THC observable chez les femelles symbiotiques âgées de deux ans. A l'inverse, cette perturbation, qui se traduit par la limitation de l'apoptose hémocytaires en présence de l'endosymbiote, permettrait d'atténuer partiellement la chute du THC.

Concernant l'influence du sexe sur les phénomènes apoptotiques, la comparaison entre mâles et femelles asymbiotiques n'a pu être réalisée pour l'heure car les données

sont toujours en cours d'acquisition.

1.2.3 Discussion

La chute du THC observée chez *A. vulgare* ne semble donc pas liée aux phénomènes d'apoptose. Par conséquent, cette chute pourrait être due à une perturbation de l'hématopoïèse soit directement par la perturbation de l'expression des gènes liés à l'hématopoïèse, comme nous l'avons évoqué précédemment, soit indirectement *via* l'activité PO. En effet, chez la crevette *Marsupenaeus japonicus*, une extinction par ARNi du gène codant la proPO entraîne une chute de l'hématopoïèse (Fagutao *et al.* 2009). Cette corrélation pourrait impliquer le gène proPO ou l'activité PO elle-même dans l'hématopoïèse (Fagutao *et al.* 2009). Or, nous savons que les femelles symbiotiques présentent moins d'activité PO et ce dès l'âge de un an. Cette diminution de l'activité PO conduirait, de façon rétroactive au cours du vieillissement, à une diminution de l'hématopoïèse. Cependant, dans notre modèle, cette hypothèse ne peut être testée à l'heure actuelle puisque nous ne connaissons pas l'enzyme responsable de l'activité PO chez *A. vulgare*.

L'étude de l'apoptose a mis en évidence que les hémocytes des femelles symbiotiques présentent moins de phénomènes apoptotiques que les hémocytes des femelles asymbiotiques. Des relations entre *Wolbachia* et l'apoptose ont par ailleurs déjà été mises en évidence dans deux modèles. Dans le modèle *Brugia malayi*/*Wolbachia*, la protéine de surface WSP (*Wolbachia* Surface Protein) possède des propriétés anti-apoptotiques lorsqu'elle est mise en présence de granulocytes humains, *in vitro* (Bazzocchi *et al.* 2007). Chez le parasitoïde *Asobara tabida*, *Wolbachia* est indispensable à l'ovogenèse puisqu'en son absence les ovocytes entrent en apoptose (Pannebakker *et al.* 2007). Dans notre modèle, ces phénomènes de mort cellulaire programmée semblent donc perturbés par la présence de *Wolbachia*. Ceci tendrait à confirmer la relation étroite que peuvent entretenir *Wolbachia* et les phénomènes apoptotiques. Cette relation pourrait s'expliquer relativement simplement par la nécessité, pour la

bactérie, de se maintenir dans sa cellule hôte.

Cette diminution de l'apoptose des hémocytes chez les animaux symbiotiques pourrait avoir des conséquences directes sur l'immunocompétence de l'hôte. En effet, l'apoptose est un mécanisme de défense vis-à-vis de certains agents pathogènes intracellulaires, tels que les virus, qui permet d'éliminer la cellule infectée avant que l'agent pathogène ait eu le temps de se répliquer (Johnson *et al.* 2008). Or, l'interférence de *Wolbachia* dans la mise en place de l'apoptose pourrait favoriser la multiplication de tels agents pathogènes. En revanche, d'autres agents pathogènes, tels que certains virus à ARN, induisent l'apoptose de leur cellule hôte afin de se répandre. Une inhibition de ces phénomènes apoptotiques par *Wolbachia* pourrait alors conférer une résistance à ces virus, comme cela est suggéré chez *D. melanogaster* (Teixeira *et al.* 2008). Par ailleurs, les cellules apoptotiques pourraient jouer un rôle dans l'activation de la PO. En effet, les phosphatidylsérines pourraient activer les enzymes responsables de l'activité PO, à savoir l'enzyme PO ou l'hémocyanine (Bidla *et al.* 2009 ; Coates *et al.* 2011). Or une quantité moindre de phosphatidylsérines exposés à la surface des cellules (que ce soit par les hémocytes ou par les cellules des différents tissus lésés) lors d'une infection chez les femelles symbiotiques pourrait localement conduire à une activation plus limitée de la PO et, par conséquent, pourrait faciliter la dissémination des agents pathogènes. Ceci pourrait par ailleurs expliquer la plus forte septicémie naturelle que l'on rencontre dans l'hémolymphe des animaux symbiotiques à l'âge de deux ans (Braquart-Varnier *et al.* 2008).

1.3 Impact de la présence de *Wolbachia* sur d'autres paramètres immunitaires

Afin d'avoir une vision plus générale de la perturbation des réactions immunitaires d'*A. vulgare* en présence de *Wolbachia*, l'étude de deux autres paramètres immunitaires sont en cours de développement : la capacité phagocytaire et l'encapsulation.

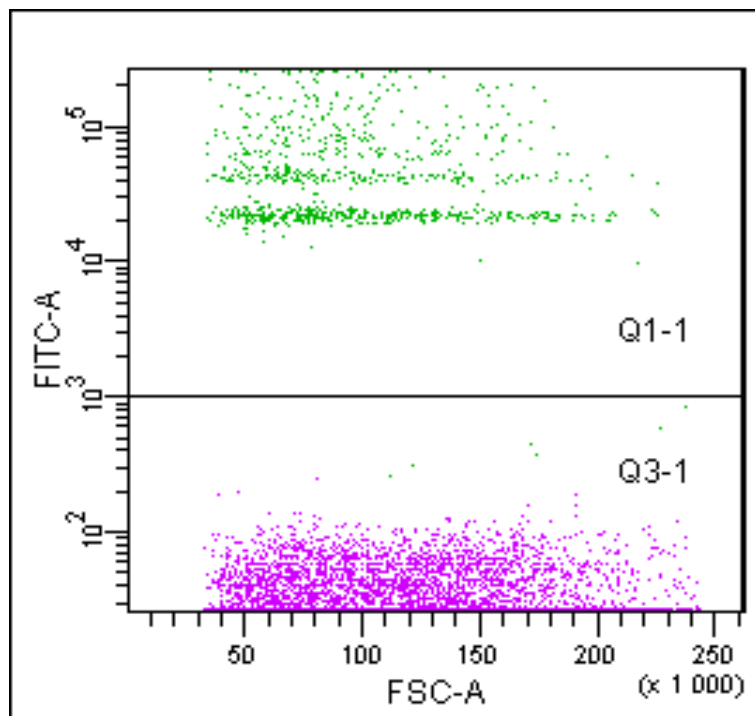


FIGURE III-12 – Fenêtrage issu de l'analyse de l'hémolymph de *A. vulgare* montrant la séparation des événements fluorescents (Q1-1) des événements non fluorescents (Q3-1).

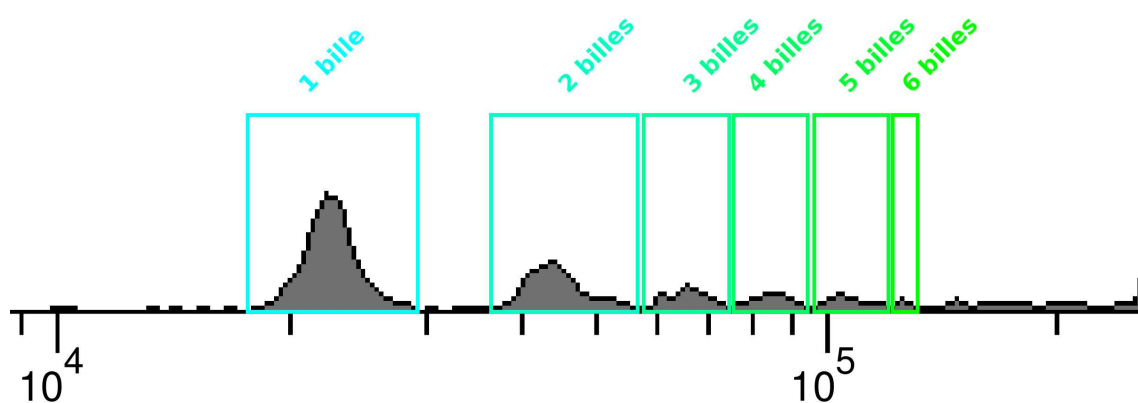


FIGURE III-13 – Quantité d'hémocytes d'*A. vulgare* ayant phagocyté 1 à 6 billes fluorescentes.

1.3.1 Capacité phagocytaire¹

La quantification de la capacité phagocytaire peut être réalisée à l'aide d'un outil que nous avons déjà développé : la cytométrie en flux. Cette approche repose sur l'utilisation de billes fluorescentes ($\varnothing \sim 2 \mu\text{m}$) et permet de quantifier sur un grand nombre d'échantillons la proportion d'hémocytes ayant phagocyté ces billes. Cette approche nous permet aussi de compter le nombre de billes phagocytées par hémocyte, la fluorescence de chaque cellule étant proportionnelle au nombre de billes phagocytées. Ceci nous permettra par conséquent d'avoir une vision à la fois globale (au niveau de l'hémolymph) (Figure III-12) et précise (au niveau de l'hémocyte) (Figure III-13) des perturbations provoquées par la présence de *Wolbachia* dans une comparaison entre animaux symbiotiques et asymbiotiques.

Un premier test a été mené en injectant des billes fluorescentes dans la cavité générale d'animaux puis en prélevant l'hémolymph 30 minutes, 1h, 2h ou 4h après injection. L'analyse de l'hémolymph a révélé la présence d'événements fluorescents correspondant à des hémocytes ayant potentiellement phagocyté une à plusieurs billes. Cependant, une observation en microscopie confocale est nécessaire pour confirmer l'internalisation de ces billes. Cette première cinétique montre que l'activité phagocytaire est croissante au cours du temps, 10 % des cellules ayant phagocyté au bout de 4h (Figure III-14). Par conséquent, des études plus poussées doivent être réalisées afin de caractériser la cinétique complète de phagocytose et de la comparer entre animaux symbiotiques et asymbiotiques. Cette étude préliminaire a également mis en évidence une activité phagocytaire potentielle des hémocytes granulaires (Figure III-15). Ces hémocytes ont été décrits dans notre modèle comme non phagocytaire. Toutefois les hémocytes peuvent avoir des activités de phagocytose différentes en fonction des cibles à phagocyter comme des études récentes le montrent (pour revue Matozzo et Marin 2010).

1. Les résultats concernant la phagocytose et l'étalement ont été obtenus au cours du stage de Romain Pigeault, étudiant en 3^e année de Licence Écologie et Biologie des Organismes, que j'ai co-encadré avec Christine Braquart-Varnier.

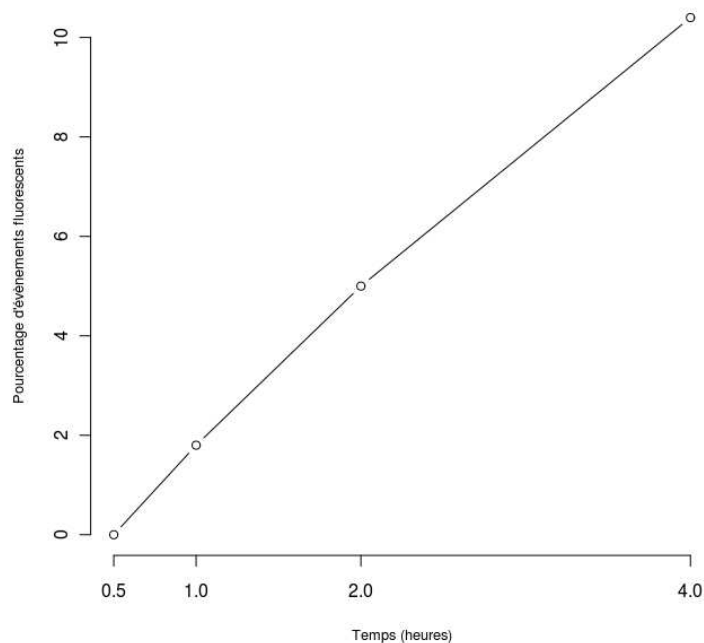


FIGURE III-14 – Cinétique des capacités phagocytaires totales au sein de l'hémolymphe analysée par cytométrie en flux. Les événements fluorescents correspondent à l'association entre un hémocyte et une ou plusieurs billes.

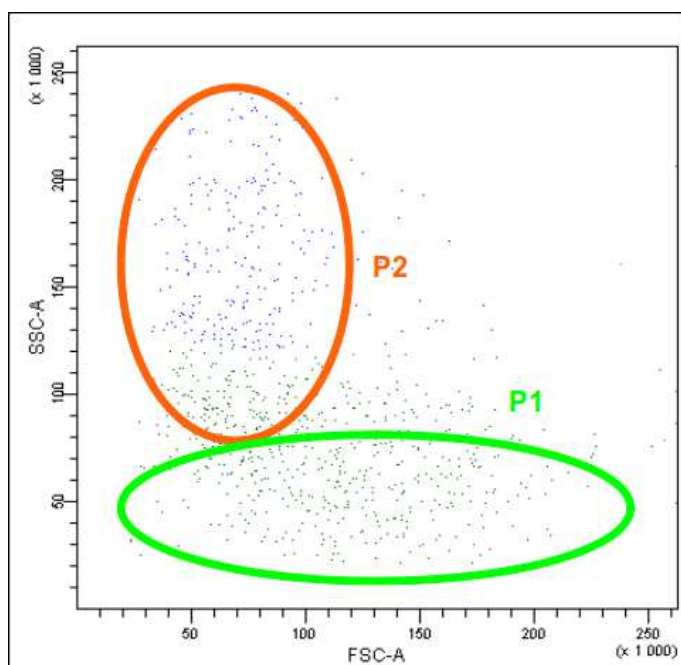


FIGURE III-15 – Répartition des événements fluorescents dans les populations P1 et P2. Les événements fluorescents correspondent à l'association entre un hémocyte (hyalin ou semi-granulaire pour P1 et granulaire pour P2) et une ou plusieurs billes.

S'il s'avère qu'il existe une différence dans la capacité phagocytaire des hémocytes en présence de *Wolbachia*, l'observation des cellules en FISH permettra d'observer le nombre de billes phagocytées en fonction du type hémocytaire (lorsque nous disposerons des marqueurs des différents types hémocytaires) et en fonction de la présence de la *Wolbachia*.

1.3.2 Encapsulement et étalement cellulaire

L'encapsulement pourrait constituer l'autre grande réaction immunitaire potentiellement perturbée par la présence de *Wolbachia*, comme cela est le cas chez les larves de *D. simulans* (Fytrou *et al.* 2006). La mise en place d'une telle réaction nécessite un nombre important d'hémocytes et de bonnes capacités d'étalement de ces derniers. Par conséquent le THC et les capacités d'étalement pourraient être corrélées à la capacité d'encapsulement. Dans cette hypothèse, il se pourrait que les animaux symbiotiques âgés de deux ans, possédant moins d'hémocytes circulants, puissent avoir des capacités d'encapsulement réduites.

Un protocole préliminaire, reposant sur l'injection de billes de Sephadex[®] ($\varnothing \sim 100 \mu\text{m}$) dans la cavité générale, a permis d'obtenir quelques billes encapsulées et mélanisées 8 jours post-injection (Figure III-16). Cependant, de nombreuses améliorations restent à effectuer. La méthode d'injection des billes, qui ont un diamètre relativement important, est traumatique pour les individus et entraîne une forte mortalité. Le nombre de billes injectées est quant à lui difficile à maîtriser. Le délai entre l'injection et la récupération des billes par dissection devra être déterminé précisément (réalisation d'une cinétique) afin d'établir une période d'incubation optimale. Une fois ce protocole mis au point, cette réaction cellulaire sera quantifiée en terme d'efficacité d'encapsulement. Les billes récupérées pourront être classées en trois catégories : les billes encapsulées et totalement mélanisées, les billes encapsulées et partiellement mélanisées et les billes restées intactes. Cette approche nous permettra ainsi d'obtenir une information à la fois quantitative (nombre de billes

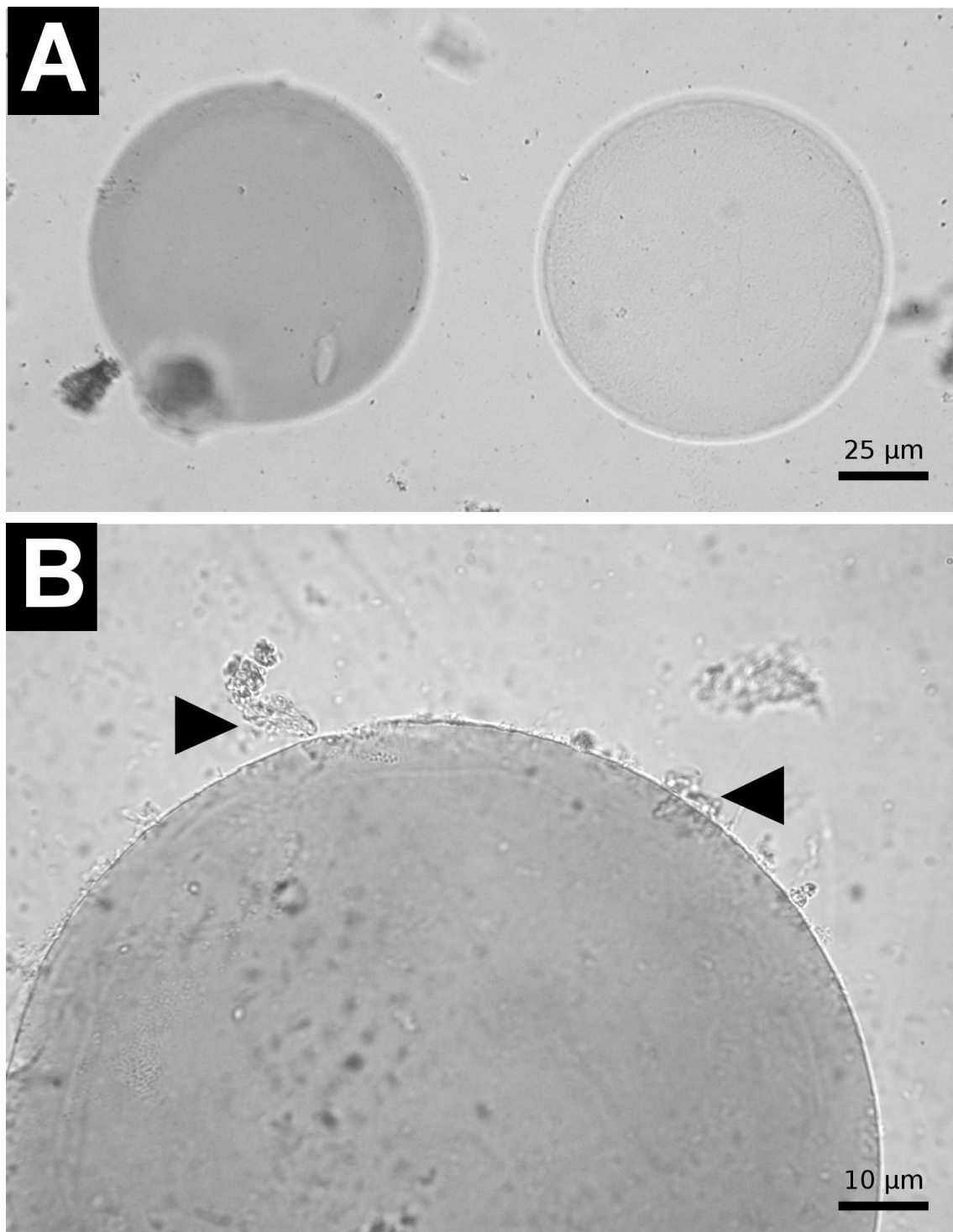


FIGURE III-16 – Billes de Sephadex[®] encapsulées par des femelles *A. vulgare*. **A** : la bille de gauche est encapsulée et mélanisée alors que la bille de droite est restée intacte. **B** : présence d'hémocytes sur la bille (têtes de flèche).

encapsulées) et qualitative (taux de mélanisation).

La présence de *Wolbachia* à l'intérieur des hémocytes pourrait également perturber la capacité de ces derniers à s'étaler. Cette capacité peut être mesurée par la surface d'étalement d'une cellule après adhésion à un support. Afin d'obtenir un étalement maximal de chaque cellule, il est nécessaire d'estimer le temps optimal d'étalement afin de ne pas induire de biais. Chaque type hémocytaire ayant probablement des capacités d'étalement propres, un marquage en FISH sera nécessaire afin d'identifier chaque type cellulaire ainsi que d'y associer d'éventuelles perturbations d'étalement en présence de *Wolbachia*.

Des premiers essais d'étalement sur des surfaces simples telles que le verre ou le plastique ont montré que les hémocytes possédaient une dynamique d'étalement ininterrompue. Ces surfaces ne permettant pas de stabiliser l'étalement, une matrice extracellulaire artificielle (MatrigelTM, BD Sciences) sera par conséquent testée prochainement.

L'ensemble des résultats concernant la chute du THC ainsi que la chute de l'activité PO observées chez les femelles symbiotiques suggère que ces femelles présenteraient *a priori* une immunocompétence plus faible que celle des femelles asymbiotiques. Cependant, ces paramètres, à eux seuls, ne nous permettent pas de statuer avec certitude sur la qualité de l'immunocompétence des femelles symbiotiques et asymbiotiques. Par conséquent, pour estimer cette immunocompétence, nous avons quantifié, en parallèle des paramètres immunitaires, le taux de survie d'individus symbiotiques et asymbiotiques suite à des infections expérimentales.

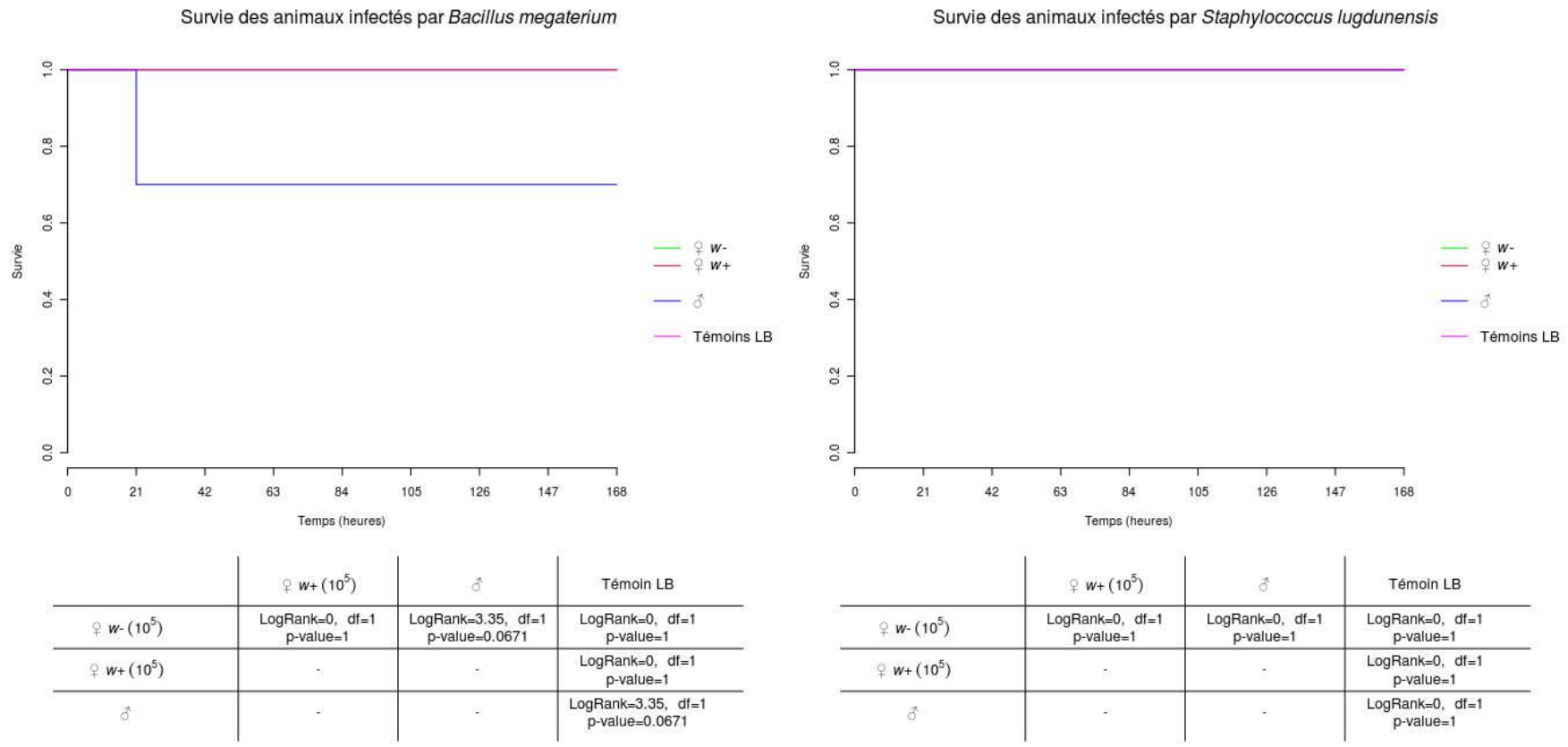


FIGURE III-17 – Courbes de survie d'*A. vulgare* infectés par des bactéries Gram(+) (*B. megaterium*, *S. lugdunensis*) au mode de vie extracellulaire. Chaque bactérie a été injectée à des femelles asymbiotiques ($w-$) et symbiotiques ($w+$) ainsi qu'à des mâles. Pour chaque injection, des animaux injectés avec du milieu LB stérile servent de témoins. Le résultat statistique des comparaisons deux à deux des courbes est mentionné dans chaque tableau. Lorsque $p < 0,05$, le résultat est affiché en rouge.

2 Impact de *Wolabchia* sur l'immunocompétence

Dans le milieu naturel, une réponse efficace contre un agent pathogène, c'est-à-dire permettant l'élimination de cet agent pathogène et la survie de l'individu, est une preuve d'une immunocompétence suffisante pour combattre cet agent pathogène. La réalisation d'infections expérimentales est par conséquent un très bon indicateur de ce niveau d'immunocompétence. Chez *A. vulgare*, nous avons entrepris deux types d'infections : des infections bactériennes et des infections fongiques (Tableau III-1). Le choix des micro-organismes s'est basé principalement sur des critères concernant la composition des PGN ainsi que sur le mode de vie extra ou intracellulaire des agents pathogènes.

Tableau III-1 – Micro-organismes utilisés pour les infections expérimentales. Les types de PGN ainsi que leur mode de vie sont précisés pour chacun des micro-organismes utilisés (DAP : diaminopimélique, Lys : lysine, TCT : *tracheal cytotoxin*).

Type	Nom	Type de PGN	Mode de vie
Gram(+)	<i>Bacillus megaterium</i>	Type DAP	extracellulaire
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Type Lys	extracellulaire
	<i>Listeria ivanovii</i>	Type DAP	intracellulaire
Gram(–)	<i>Salmonella typhimurium</i>	Type DAP	intracellulaire
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Type TCT	extracellulaire
	<i>Escherichia coli</i>	Type DAP	extracellulaire
Champignon	<i>Metarhizium anisopliae</i>	β -glucanes	extracellulaire

2.1 Infections bactériennes

Les infections bactériennes ont eu pour objectif de tester la sensibilité d'*A. vulgare* aux bactéries Gram(+) et Gram(–) aux modes de vie extra ou intracellulaire et de mettre en évidence l'impact de la présence de *Wolbachia* sur la réponse à ces agents pathogènes, c'est-à-dire d'observer des phénomènes de protection ou d'accroissement de la sensibilité en présence de l'endosymbiote. Les souches bactériennes utilisées pour les infections expérimentales sont indiquées dans le tableau III-1. Pour

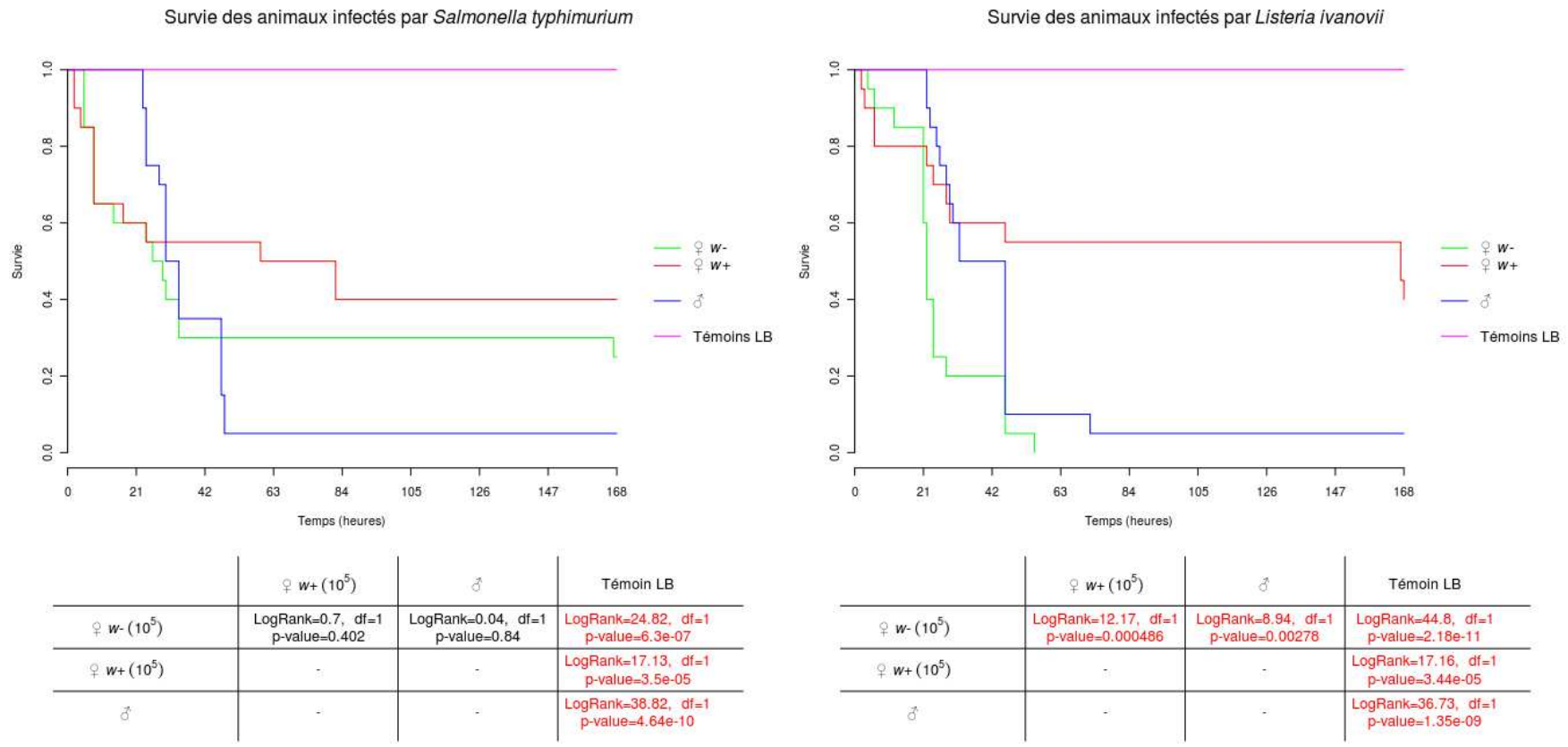


FIGURE III-18 – Courbes de survie d'*A. vulgare* infectés par des bactéries Gram(+) (*L. ivanovii*) et Gram(−) (*Sa. typhimurium*) au mode de vie intracellulaire. Chaque bactérie a été injectée à des femelles asymbiotiques (*w*−) et symbiotiques (*w*+) ainsi qu'à des mâles. Pour chaque injection, des animaux injectés avec du milieu LB stérile servent de témoins. Le résultat statistique des comparaisons deux à deux des courbes est mentionné dans chaque tableau. Lorsque $p < 0,05$, le résultat est affiché en rouge.

chacun des trois types de souches Gram(+) ou Gram(-), deux ont un mode de vie extracellulaire et une un mode de vie intracellulaire. Quatre souches bactériennes présentent des PGN de type DAP, une présente des PGN de type lysine et enfin une autre, des PGN de type TCT. Ces infections expérimentales ont nécessité, pour chaque souche, une optimisation de la quantité de bactéries injectées dans le but de ne pas engendrer une mortalité précoce ou une absence de réponse immunitaire des individus infectés. La quantité optimale pour l'ensemble des souches a ainsi été estimée à 10^5 bactéries, excepté pour *Vibrio alginolyticus* évaluée à 10^3 bactéries. Des femelles symbiotiques et asymbiotiques ainsi que des mâles, tous âgés de un an, ont été infectés avec ces différentes souches et leur taux de survie a été suivi à temps régulier sur une semaine avec un pas de 1h les premières 32h, un pas de 2h les 48h suivantes et un pas de 24h jusqu'à 168h. Pour chacune de ces infections, des individus témoins ont été injectés avec du milieu de culture LB stérile. Chaque infection a été réalisée deux fois avec l'injection de cultures bactériennes indépendantes chez 10 individus, excepté pour *Escherichia coli* pour lequel nous n'avons pas encore réalisé de réplicat. La concentration des cultures bactériennes a été vérifiée par étalement sur boîte de Pétri. Les résultats ont ensuite été analysés par un test de LogRank. Les résultats sont présentés dans les figures [III-17](#), [III-18](#) et [III-19](#).

Ces expériences ont montré que les femelles infectées ou non par *Wolbachia* ainsi que les mâles ne sont pas sensibles à une infection par *Bacillus megaterium* et *Staphylococcus lugdunensis* puisqu'il n'y a pas de différences avec les individus témoins. Les animaux infectés par *Salmonella typhimurium* présentent une sensibilité à cette bactérie puisque, à l'issue des 7 jours de suivi, 30 à 40 % des femelles infectées ou non par *Wolbachia* et 5 % des mâles ont survécu alors que les individus témoins sont tous vivants. Il n'existe cependant pas de différences entre femelles asymbiotiques et symbiotiques ou entre femelles asymbiotiques et mâles. Lors d'une infection par *E. coli*, seules les femelles asymbiotiques semblent sensibles à la bactérie mais, une

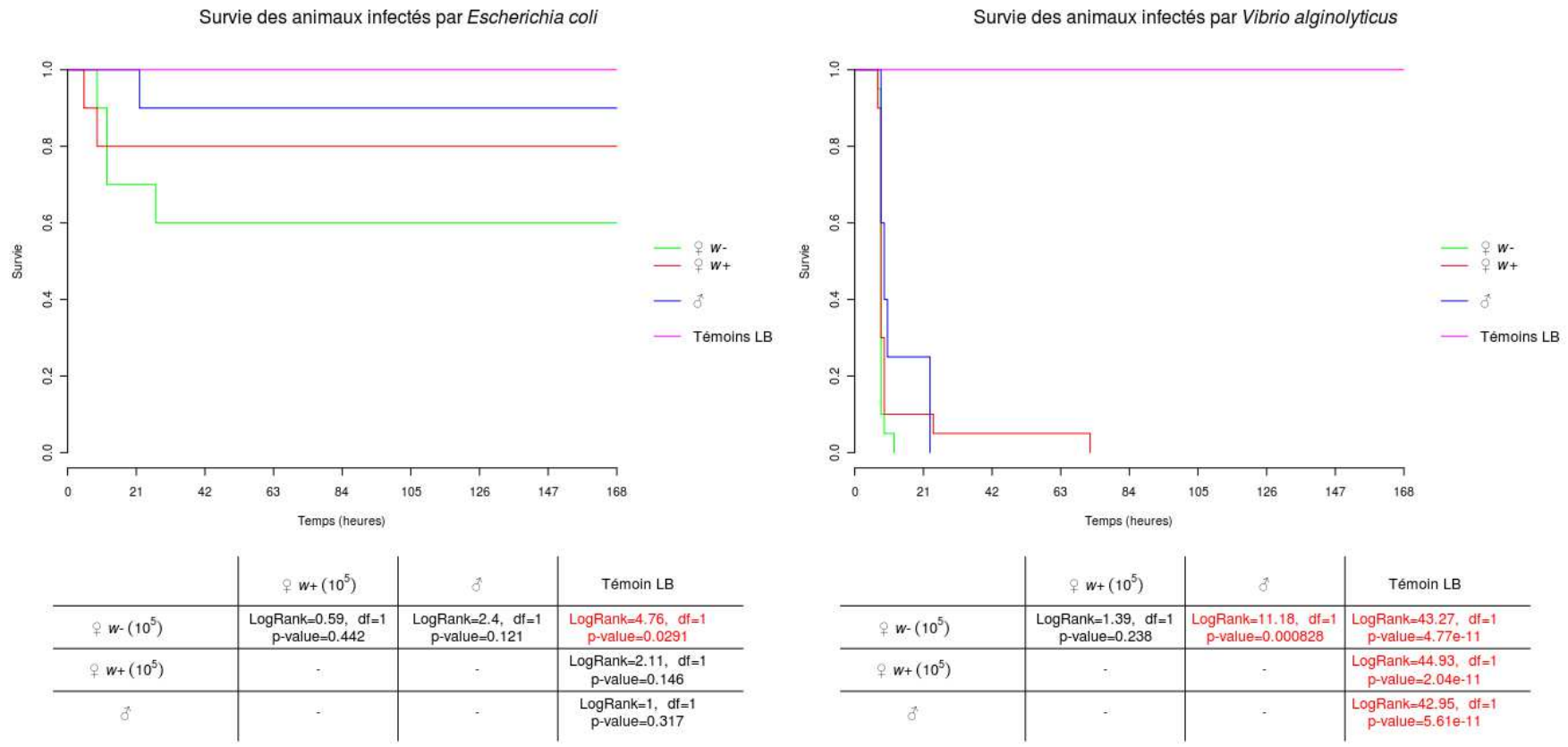


FIGURE III-19 – Courbes de survie d'*A. vulgare* infectés par des bactéries Gram(−) (*V. alginolyticus*, *E. coli*) au mode de vie extracellulaire. Chaque bactérie a été injectée à des femelles asymbiotiques (*w*−) et symbiotiques (*w*+) ainsi qu'à des mâles. Pour chaque injection, des animaux injectés avec du milieu LB stérile servent de témoins. Le résultat statistique des comparaisons deux à deux des courbes est mentionné dans chaque tableau. Lorsque $p < 0,05$, le résultat est affiché en rouge.

fois encore, le taux de survie des différentes catégories d'individus ne présente aucune différence. Enfin, quelque soit leur statut symbiotique ou leur sexe, les animaux sont tous extrêmement sensibles à *V. alginolyticus* puisque 100 % des femelles asymbiotiques et des mâles meurent en moins de 24h et 100 % des femelles symbiotiques en 72h alors que les individus témoins sont en vie tout au long du suivi. Aucune différence statistique entre femelles asymbiotiques ou symbiotiques n'est observable. En revanche, les mâles sont plus résistants à cette bactérie que les femelles asymbiotiques puisque ces derniers survivent jusqu'à 23h après infection contre 12h pour les femelles. Lors d'une infection avec *Listeria ivanovii*, la mortalité chez les femelles asymbiotiques atteint 100 % après 2,5 jours post-injection alors que 40 % des femelles symbiotiques sont toujours en vie au bout de 7 jours. De leur côté, les mâles semblent plus résistants que les femelles asymbiotiques puisque 5 % d'entre eux survivent à l'infection.

Ainsi à la vue de l'ensemble des résultats, les bactéries Gram(+) et Gram(-) portant des PGN de type DAP (*B. megaterium*, *L. ivanovii*, *Sa. typhimurium*, *E. coli*), de type Lys (*S. lugdunensis*) ou de type TCT (*V. alginolyticus*) sont susceptibles de déclencher une réponse immunitaire qui peut, lorsque cette réponse est efficace, permettre à l'animal de survivre à l'infection bactérienne. Si l'on considère les femelles asymbiotiques, celles-ci semblent plus immunocompétentes vis-à-vis des bactéries Gram(+) que des bactéries Gram(-) puisque seule une souche Gram(+) induit une mortalité (*L. ivanovii*) alors que les trois souches Gram(-) présente un effet pathogène. Si l'on considère le mode de vie des bactéries, ces femelles semblent aussi sensibles aux bactéries extracellulaires (*E. coli* et *V. alginolyticus*) qu'aux bactéries intracellulaires (*L. ivanovii* et *Sa. typhimurium*).

Les mâles présentent la même sensibilité que les femelles asymbiotiques hormis pour une bactérie Gram(-) extracellulaire, *E. coli*. Cependant, cette différence mérite d'être confirmée par d'autres réplicats biologiques. La comparaison des mâles aux femelles asymbiotiques révèle que l'immunocompétence des mâles ne semble pas

différer de celle des femelles asymbiotiques hormis envers *V. alginolyticus* et *L. ivanovii*. En effet, les mâles survivent un peu plus longtemps que les femelles lors de l'infection par ces deux souches bactériennes. Ceci pourrait être dû aux différences mesurées au niveau du THC ou de l'activité PO.

Concernant les femelles symbiotiques, la présence de *Wolbachia* ne confère pas de sensibilité particulière vis-à-vis des souches injectées. En effet, ces femelles présentent le même patron de sensibilité que celui des mâles. En revanche, les femelles symbiotiques présentent une meilleure immunocompétence que celle des femelles asymbiotiques face à une infection par *L. ivanovii*. Ceci suggère que la présence de *Wolbachia* conférerait une protection aux femelles *A. vulgare* contre les infections de cette bactérie intracellulaire à une concentration de 10^5 bactéries. μL^{-1} . Cette protection peut avoir deux origines non exclusives : (i) une compétition entre *Wolbachia* et *L. ivanovii* (compétition d'espace ou de ressources) ou (ii) une stimulation d'une voie de défense particulière incluant un PRR intracellulaire, qui aurait un rôle analogue au PGRP-LE impliqué dans la reconnaissance des *Listeria* chez *D. melanogaster* (Yano et Kurata 2008).

2.2 Infections fongiques

Afin d'observer un effet de la présence de *Wolbachia* sur l'immunocompétence des individus face à un autre type d'agents pathogènes que les bactéries, nous avons réalisé des infections fongiques en utilisant le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Ce champignon, pouvant être cultivé sur milieu solide et simple de manipulation, est couramment utilisé chez les insectes pour évaluer leur immunocompétence face à cet agent pathogène (Gottar *et al.* 2006 ; Miller *et al.* 2009 ; Moret et Siva-Jothy 2003 ; Reber *et al.* 2008 ; Traniello *et al.* 2002 ; Wang et Xia 2010).

Deux séries d'infections ont été réalisées sur des *A. vulgare* femelles symbiotiques et asymbiotiques ainsi que sur des mâles. Le coléoptère *Tenebrio molitor*, sensible

à ce champignon (Moret et Siva-Jothy 2003), a été utilisé comme témoin. La première série n'a révélé aucun effet pathogène du champignon vis-à-vis de *T. molitor* ou d'*A. vulgare* durant les six mois de suivi. La maturité des asques pouvant être mise en question lors de cette expérimentation puisque ne libérant par leurs spores par agitation modérée, nous avons renouvelé l'infection en tentant d'optimiser les conditions de culture du champignon afin d'obtenir la maturité nécessaire. Cependant, la seconde série d'infections n'a elle aussi révélé aucun effet pathogène ni chez *T. molitor* ni chez *A. vulgare*. Cette absence de pathogénie pourrait provenir une nouvelle fois de la maturité des spores, bien que ceci soit relativement peu probable car ces dernières semblaient matures, ou alors d'un problème de manipulation au moment de l'infection même des animaux. Ce dernier point devra donc faire l'objet d'amélioration pour s'assurer que l'infection se déroule correctement.

3 Conclusion et perspectives

L'immunocompétence d'*A. vulgare* est influencée par la présence de *Wolbachia*. Toutefois les mesures à la fois de paramètres immunitaires et de taux de survie d'individus suite à une infection apportent des résultats qui peuvent apparaître comme contradictoires. En effet, la mesure du THC et de l'activité PO, ainsi que celle des phénomènes apoptotiques, conduit à penser que *Wolbachia* diminuerait l'immunocompétence de son hôte, alors que la mesure de la résistance à *L. ivanovi* montre clairement un effet bénéfique de la présence de *Wolbachia*. Cependant, rappelons-nous que la mesure de paramètres immunitaires ne permet d'avoir qu'une vue partielle de l'immunocompétence des individus alors que la mesure du taux de survie donne une vision exacte sans toutefois connaître quelles sont les réactions immunitaires impliquées. Ceci démontre bien, une nouvelle fois, l'importance et la complémentarité de ces deux approches.

L'immunocompétence d'*A. vulgare* est aussi influencée par l'âge et le sexe. En

effet, le THC et l'activité PO diminuent au cours du vieillissement que ce soit chez les femelles ou chez les mâles. L'impact du vieillissement est donc un paramètre important à prendre en compte lors de nos investigations. Par ailleurs, ce paramètre est rarement étudié chez les invertébrés car la plupart d'entre eux ont une vie courte, entre autre les modèles à *Wolbachia*, contrairement à notre modèle dont la durée de vie est de l'ordre de trois ans dans nos conditions d'élevage. De plus, on peut noter l'influence de *Wolbachia* sur le vieillissement puisque la bactérie semble en accélérer les effets que ce soit sur le THC ou l'activité PO. Enfin, l'effet du sexe a aussi été mis en évidence : les mâles présentent un THC plus important au cours de leur vie mais une activité PO plus réduite que les femelles. Ceci semble toutefois ne pas avoir d'influence nette sur l'immunocompétence des mâles par rapport aux femelles asymbiotiques puisqu'ils réagissent à peu près de la même manière lors des différentes infections bactériennes réalisées.

Ce travail se poursuivra en premier lieu par la mesure des taux de survies d'animaux âgés de deux ans afin de savoir si l'effet protecteur mis en évidence perdure au cours de l'âge. De plus, un autre aspect de ces infections expérimentales devra être exploré : il s'agit d'un éventuel effet dose de l'infection. Il se pourrait que différentes quantités de bactéries injectées amènent à des réponses différentes en fonction de la présence de *Wolbachia* ou du sexe. Ainsi *Wolbachia* pourrait conférer une protection à partir d'une certaine quantité de bactéries injectées. Par ailleurs, l'élargissement du répertoire de souches bactériennes donnera une vision plus précise de la protection que peut conférer *Wolbachia*. Des infections devront être menées avec des souches bactériennes rencontrées naturellement par *A. vulgare*, plus particulièrement celles retrouvées dans l'hémolymphe (septicémie naturelle décrite par Braquart-Varnier *et al.* (2008)) ou au niveau du tube digestif. Actuellement, la thèse de Jessica Dittmer (direction D. Bouchon et M. Johnson) portant sur la diversité bactérienne chez *A. vulgare* devrait permettre d'identifier et d'isoler ces types de souches. D'autre

part, l'utilisation d'autres types d'agents pathogènes tels que des champignons ou des virus pourra révéler d'autres effets de l'impact de la présence de *Wolbachia* sur l'immunocompétence.

Cette approche par infections expérimentales permettra également d'étudier au niveau cellulaire la réaction de *Wolbachia* face à un troisième partenaire (bactérie extra ou intracellulaire, champignon ou virus). En effet, la localisation de *Wolbachia* et du troisième partenaire par FISH ou immunocytochimie permettra d'observer le comportement de *Wolbachia* suite à cette infection et de mettre en évidence la stabilité de l'interaction symbiotique face à ce nouveau partenaire. De plus, dans le cas de *L. ivanovii*, cette approche pourrait révéler un mécanisme potentiel de résistance face à cette bactérie en présence de *Wolbachia*. En effet, une absence de co-localisation de *L. ivanovii* et de *Wolbachia* suggérerait une exclusion de la bactérie pathogène en présence de l'endosymbiote (comme c'est le cas pour certains virus chez les moustiques transfectés par la souche virulente de *Wolbachia wMelPop* (Moreira *et al.* 2009)) alors qu'une co-localisation suggérerait une interaction directe ou indirecte entre l'endosymbiote et la bactérie pathogène.

En parallèle de ces futures approches, de nouveaux paramètres immunitaires devront être mesurés afin de compléter la vision actuelle de l'influence de *Wolbachia* sur les différents paramètres immunitaires. La mesure des capacités phagocytaires et de l'encapsulation, dont le protocole est en cours de mise au point, sera complétée par la mesure d'un autre paramètre, la production d'espèces réactives (ROS et RNS) reflétant la capacité à générer un stress oxydant. Cette production de ROS constitue, au même titre que la libération d'AMP, une des premières lignes de défense mise en place face à l'entrée d'un agent pathogène dans un organisme.

Un autre phénomène sera également étudié : le recouvrement hémocytaire qui correspond au comblement du déficit d'hémocytes provoqué par leur mobilisation suite à une blessure aseptique ou septique. Le bon déroulement de ce processus pourrait être critique pour les animaux symbiotiques âgés qui présentent un THC plus

faible. Expérimentalement, il s'agirait de quantifier le THC d'un même individu au moment de la blessure puis après un délai pouvant aller de plusieurs minutes à plusieurs heures. L'utilisation de plusieurs individus permettra d'établir une cinétique. La vitesse de ce recouvrement indiquera la capacité à produire plus ou moins rapidement de nouveaux hémocytes et donnera une indication de l'impact de la présence de *Wolbachia* sur l'hématopoïèse.

Les résultats concernant l'hypothèse selon laquelle l'origine de la chute du taux d'hémocytes pourrait impliquer des phénomènes apoptotiques se sont révélés surprenants. En effet, l'hypothèse de l'induction de l'apoptose en présence de *Wolbachia* a été rejetée puisque, au niveau des organes hématopoïétiques, aucune différence n'a été observée et, au niveau des hémocytes, la présence de *Wolbachia* semble au contraire protéger contre l'entrée en apoptose. Toutefois sur ce dernier point, l'implication directe de *Wolbachia* n'est pas démontrée. Afin de confirmer le rôle direct de la bactérie, cette dernière doit être injectée à des animaux asymbiotiques afin de mettre en évidence une diminution des phénomènes apoptotiques due à *Wolbachia*. A l'heure actuelle, les animaux ont été injectés et la mesure des phénomènes apoptotiques sera réalisée dans quelques semaines, 6 mois après l'injection des bactéries.

Quoiqu'il en soit, ces travaux n'ont pas permis d'expliquer la cause de la chute du THC. La seconde hypothèse concernant l'impact de la présence de *Wolbachia* sur l'expression des gènes liés à l'hématopoïèse a donc été testée. Ceci a été permis par l'identification de nombreux gènes impliqués dans l'immunité, en particulier dans l'hématopoïèse, *via* une approche transcriptomique massive qui a débuté lors de mon entrée en thèse.

Chapitre 3

Conséquences de la symbiose à *Wolbachia* sur l'expression de gènes de l'immunité

La perturbation des compétences immunitaires d'un hôte porteur de *Wolbachia* pourrait être la conséquence d'une modification de l'expression des gènes de l'immunité. Toutefois, très peu d'études ont été réalisées pour tester cette hypothèse. Chez les drosophiles, la perturbation de l'encapsulement (Fytrou *et al.* 2006) ou la résistance aux virus (Hedges *et al.* 2008 ; Teixeira *et al.* 2008) n'ont fait l'objet d'aucune étude sur l'expression de gènes impliqués dans ce type de réponse immunitaire. En revanche, chez *Ae. aegypti* et *An. gambiae* transfectés avec la souche virulente *wMelPop* qui leur confère une résistance à différents types d'agents pathogènes tels que des virus (Bian *et al.* 2010 ; Moreira *et al.* 2009), des protozoaires (Kambris *et al.* 2010 ; Moreira *et al.* 2009), des filaires (Kambris *et al.* 2009) ou des bactéries entomopathogènes (Kambris *et al.* 2009), une augmentation de l'expression des gènes de l'immunité a été mise en évidence. Même si le lien entre l'augmentation de la résistance suite à la transfection de *Wolbachia* et l'augmentation de l'expression des gènes de l'immunité ne soit pas encore établi, la seule présence de *Wolbachia*

introduite artificiellement suffit à stimuler l'expression de ces gènes.

Chez *A. vulgare*, la présence de *Wolbachia* influence négativement les paramètres immunitaires, à savoir le THC et l'activité PO, mais a un impact positif sur l'immunocompétence suite à une infection par *L. ivanovii*. Ces modifications, à l'image des systèmes précédents, pourraient être dues à une modulation de l'expression des gènes de l'immunité en présence du symbiote.

Afin de savoir si cette perturbation de l'immunocompétence chez les individus symbiotiques peut être reliée à une modulation de l'expression des gènes de l'immunité, plusieurs banques d'EST (*Expressed Sequence Tag*) ont été réalisées dans le cadre du contrat ANR EndoSymbArt (*endosymbioses chez les arthropodes*, coordinateur D. Bouchon, 2006–2010), couplé à un contrat avec le Genoscope *Immune Genomics in Invertebrate Endosymbiosis* (coordinateur A. Heddi, 2007–2010) ayant en charge le séquençage de ces banques. Le projet ANR avait pour objectif de comprendre l'impact d'un symbiote permanent sur son hôte, celui du projet Génoscope étant de comprendre l'impact d'un agent pathogène transitoire sur ce même hôte. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions hôte/*Wolbachia* n'étant pas connus, que ce soit par rapport à la féminisation ou au coût induit par la bactérie, deux types d'échantillons ont été utilisés pour réaliser ces banques d'EST : des ovaires (tissu le plus infecté et siège de la transmission de la bactérie à la descendance) pour identifier les gènes impliqués dans l'association hôte/symbiote et des femelles asymbiotiques infectées par un agent pathogène intracellulaire afin de mettre en évidence les principales voies immunitaires d'*A. vulgare* activée par une bactérie ayant ce mode de vie.

L'analyse des banques nous a permis d'accroître considérablement les données génétiques déjà acquises sur *A. vulgare* et d'identifier de nombreux gènes immunitaires. Nous avons ensuite quantifié l'expression de 46 gènes associés à l'immunité et ce dans trois types d'échantillons porteurs ou non de *Wolbachia* : animal entier, ovaires et tissus immunitaires (hémocytes et organes hématopoïétiques). Ce travail a

fait l'objet d'une publication « Feminizing *Wolbachia* : A transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare* » paru dans BMC Microbiology en janvier 2012.

1 ANR EndoSymbArt (2006–2010) : première approche transcriptomique massive sur *A. vulgare*

1.1 Réalisation des banques d'ADNc et séquençage

L'ANR EndoSymbArt avait pour objectif principal de comprendre l'impact de trois types d'endosymbioses sur le transcriptome de leur hôte. Ce projet comprenait l'étude d'une symbiose mutualiste nutritionnelle avec le modèle *Sitophilus oryzae*/*Sitophilus* primary endosymbiont (SPE), d'une symbiose obligatoire nécessaire à la reproduction avec le modèle *A. tabida*/*Wolbachia* et d'une symbiose facultative impliquée dans la reproduction avec notre modèle. Cette approche transcriptomique a nécessité la réalisation de différentes banques d'ADNc propre à chaque modèle. Dans notre modèle, 7 banques ont été réalisées par Juline Herbinière (Tableau III-2) : deux banques non normalisées d'ovaires (animaux symbiotiques et asymbiotiques), deux banques soustractives d'ovaires (ovaires symbiotiques vs ovaires asymbiotiques et sa réciproque), deux banques soustractives d'animaux entiers asymbiotiques infectés par *Sa. typhimurium* (animaux challengés vs animaux non challengés et sa réciproque), une banque normalisée contenant les ADNc issus d'ovaires symbiotiques et asymbiotiques ainsi que des animaux asymbiotiques infectés par *Sa. typhimurium*. Le séquençage de ces banques a été effectué selon la méthode Sanger dans le cadre du projet Génoscope. Ceci nous a permis d'obtenir au total 28 806 EST.

Tableau III-2 – Ensemble des banques d'ADNc du projet EndoSymbArt. SSH = *Suppression Subtractive Hybridization* (banque soustractive), norm. = normalisée, F = femelles entières, Ov = ovaires, S = symbiotique, A = asymbiotique, C = infection de *Sa. typhimurium*, NC = pas d'infection, EST = *Expressed Sequence Tag*, Mt = séquences mitochondriales, ARNr = séquences ribosomiques, UG = nombre d'unigenes (Chevalier *et al.* 2012).

	Nom	Type de librairie	Souche	Tissus	Statut de symbiose	Statut d'infection	EST	% Mt	% ARNr	UG
Réponse de l'hôte à l'agent pathogène	SSH-C	SSH	-	F	A	C vs NC	774	5,8	0,3	315
	SSH-NC	-	F	A	NC vs C	764	10,1	2	369	
Réponse de l'hôte au symbiote	SSH-S	SSH	<i>wVulC</i>	Ov	S vs A	-	803	35,6	0	51
	SSH-A	SSH	-	Ov	A vs S	-	760	44,7	0,1	244
	OS	non norm.	<i>wVulC</i>	Ov	S	-	4349	34,7	0,1	2018
	OA	non norm.	-	Ov	A	-	5655	19,8	0,1	3237
	N	norm	-	F	A	C+NC	15501	0,8	0,1	7317

1.2 Analyse bioinformatique

Les données de séquençage (8 Go de données brutes) ont fait l'objet d'une analyse bioinformatique réalisée par Delphine Charif (Laboratoire BBE, UMR CNRS 5558, Université de Lyon). Cette analyse a consisté à exclure les séquences de mauvaises qualités, à séparer les séquences chimériques, à retirer des séquences les portions de vecteurs, les séquences d'amorces et les queues polyA puis à assembler les EST en contigs. Ainsi, nous avons obtenus 10 923 unigènes toutes conditions confondues.

Ces 10 923 unigènes sont constitués à 70 % de séquences d'EST uniques (*i.e.* singletons ; $n = 7\,673$) et à 30 % d'assemblage d'EST (contigs). La profondeur de séquençage calculée après assemblage des unigènes est de 3,5 en moyenne, ce qui reste relativement faible. Le fort taux de singleton et la faible profondeur de séquençage semblent refléter un effort de séquençage insuffisant. Par conséquent, ces banques permettent d'obtenir une bonne information qualitative mais rendent l'analyse quantitative moins informative.

Parmi l'ensemble des unigènes, 44 % d'entre eux présentent une similarité de séquences, principalement avec *Ae. aegypti* (10.5 %), *An. gambiae* (8.7 %), *D. melanogaster* (7 %) et différents Malacostracés (3.1 %). Parmi ces 44 % d'unigènes, 64,8 % présentent une e-value inférieure à e^{-20} montrant une certaine robustesse d'identification.

2 Exploitation du premier transcriptome de référence d'isopode

2.1 Identification des gènes immunitaires

La masse de données transcriptomiques obtenue avec ces 10 923 unigènes a permis d'établir le premier transcriptome de référence pour un modèle isopode. Les différentes banques et particulièrement les banques soustractives concernant les ani-

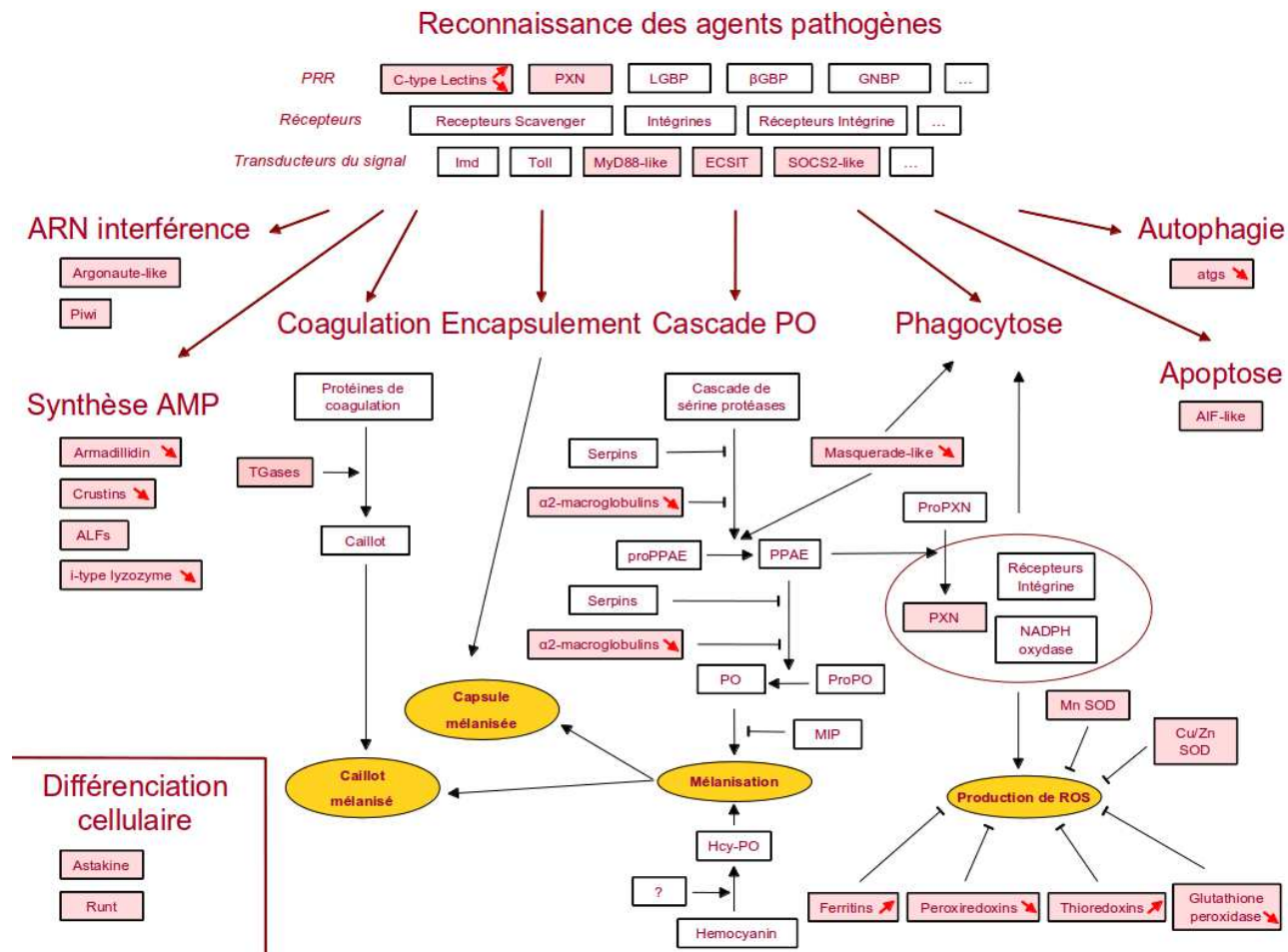


FIGURE III-20 – Principales voies immunitaires connues chez les crustacés. Les gènes de l’immunité identifiés chez *A. vulgare* sont surlignés en rose. Les flèches montantes et descendantes font référence à la sur- ou sous-expression dans les conditions symbiotiques. AIF : Apoptosis inducing factor ; ALF : Anti-lipopolysaccharide factor ; LGBP : Lipopolysaccharide and β -glucan binding protein ; β GBP : β -glucan binding protein ; ECSIT : Evolutionary conserved intermediate in the Toll pathway ; Hcy-PO : Hémocyanine à activité PO ; MIP : Melanization Inhibitor Protein ; PO : Phénoloxydase ; PPAE : Prophenoloxydase activating enzyme ; PXN : Péroxynectine ; SOCS : Suppressor of cytokine signaling ; SOD : Superoxide dismutase ; TGase : Transglutaminase ; (modifié d’après Chevalier *et al.* (2012)).

maux asymbiotiques infectés par *Salmonella* nous ont permis d'identifier 44 gènes liés à l'immunité, dont 4 avaient été identifiés au cours de la thèse de Juline Herbinière par une approche protéomique (Herbinière *et al.* 2008). Ces 4 gènes correspondent à l' α 2-macroglobuline A, la cyclophylin G, la masquerade-like A et la MnSOD. Les données issues des banques ont permis de compléter la séquence de 2 des 4 ADNc : celle de la cyclophyline G et de la MnSOD. Cependant, parmi l'ensemble des EST, deux gènes précédemment identifiés par Juline Herbinière n'ont pas été retrouvés : le gène codant l'armadillidine, un peptide antimicrobien (Herbinière *et al.* 2005), et le gène codant la transglutaminase A (Herbinière *et al.* 2008). Cette absence peut s'expliquer par le manque de profondeur de séquençage des différentes banques.

Quoiqu'il en soit, 40 nouveaux gènes liés à l'immunité ont été identifiés. Chaque annotation a été actualisée par de nouvelles recherches BLASTx et tBLASTx sur Genbank. Les unigènes avec une e-value relativement élevée ($>e^{-10}$) ou une séquence courte ont été analysés de façon plus poussée à l'aide du programme CD Search dédié à l'identification de domaines protéiques (CD Search vs the Conserved Domain Database, Marchler-Bauer *et al.* 2011). Lorsque l'ensemble des domaines pour une protéine donnée n'a pu être identifié, le suffixe « -like » a été ajouté au nom de l'unigène.

Ainsi les gènes liés à l'immunité chez *A. vulgare* ont pu être replacés dans les grandes voies immunitaires bien documentées chez les crustacés décapodes : (i) la reconnaissance des agents pathogènes (récepteurs et voies de transduction associées), (ii) l'interférence ARN, la coagulation, la voie PO, la phagocytose, l'apoptose et l'autophagie ou (iii) les AMP (Figure III-20). Parmi ces grandes voies, nous retrouvons les récepteurs impliqués dans la détection des agents pathogènes tels que les PRR dont les C-type lectines et la péroxynectine ainsi que des transducteurs du signal comme MyD88, ECSIT et SOCS2-like. Concernant la réponse immunitaire, nous retrouvons des gènes codant des AMP tels que les crustines et les ALF spécifiques des crustacés, des gènes impliqués dans l'interférence ARN à savoir argonaute-like et

piwi, des gènes nécessaires à la coagulation avec une nouvelle transglutaminase identifiée et potentiellement impliquée dans l'hématopoïèse, des gènes impliqués dans la cascade PO avec de nouveaux inhibiteurs (les α 2-macroglobulines B, C, D, E) et activateurs (masquerade-like B), des gènes impliqués dans la phagocytose tels que la péroxynectine, dans l'apoptose avec une AIF-like, dans l'autophagie avec les atg et dans la détoxification avec les SOD, peroxyrédoxine, ferritines, peroxydases et thiorédoxine (Figure III-20) (Ghosh *et al.* 2010 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006 ; Liu *et al.* 2011 ; McTaggart *et al.* 2009 ; Vazquez *et al.* 2009).

Cependant, beaucoup de gènes immunitaires clés n'ont pas été identifiés (Figure III-20). Trois hypothèses non exclusives peuvent expliquer ce fait : la faible profondeur de séquençage, la faible annotation (44 %) due à la distance phylogénétique entre les isopodes et les autres clades d'arthropodes dont les données génomiques et transcriptomiques sont disponibles et l'absence de certains gènes immunitaires chez les isopodes. Par exemple, des gènes codant d'importants récepteurs tels que les GGBP, Toll et leurs transducteurs du signal comme Imd, Dorsal, Cactus, Relish ont été identifiés chez différentes espèces de crustacés, principalement décapodes et branchiopodes (McTaggart *et al.* 2009 ; Söderhäll *et al.* 2005 ; Vazquez *et al.* 2009 ; Wang *et al.* 2009a) mais sont absents de nos banques. Pour ce qui est de l'enzyme PO responsable de l'activité PO chez les crustacés décapodes, celle-ci pourrait être absente chez les isopodes (ainsi que chez les chélicérates) (Jaenicke *et al.* 2009 ; King *et al.* 2010 ; Pless *et al.* 2003). Cette hypothèse tend à être confirmée chez *A. vulgare* puisque, au-delà de l'absence d'EST correspondant à cette enzyme au sein des banques, aucun gène n'a pu être identifié par approche PCR sur ADNc et ADNg malgré l'utilisation de très nombreuses amorces dégénérées. Ainsi chez les isopodes, cette activité PO pourrait être assurée par l'hémocyanine, comme le suggère des études récentes chez *Po. scaber* (Burmester 2002 ; Terwilliger 2007). Chez *A. vulgare*, la caractérisation des sous-unités de l'hémocyanine, amorcée au cours de la thèse de Juline Herbinière, est en cours et pourrait apporter des éclaircissements

à ce sujet. Concernant les gènes PGRP, ces derniers n'ont jamais été identifiés dans les banques d'EST de crustacés ni dans le génome de la *Da. pulex* (McTaggart *et al.* 2009), laissant penser que ces gènes seraient absents chez les crustacés.

2.2 Quantification de l'expression de gènes de l'immunité

L'expression de l'ensemble des 44 gènes liés à l'immunité et issus de l'annotation des banques (Tableau III-3) ainsi que de ceux identifiés par l'approche protéomique réalisée par Juline Herbinière (Herbinière *et al.* 2005, 2008) a été quantifiée dans 3 types d'échantillons : les animaux entiers, les ovaires et les tissus immunitaires (pool d'hémocytes et d'organes hématopoïétiques) provenant de femelles symbiotiques et asymbiotiques (Tableau III-4). Dans notre modèle, *Wolbachia* étant un symbiote facultatif, le taux d'expression de gènes des individus asymbiotiques a été pris comme référence.

Ces gènes semblent être globalement sous-exprimés au niveau des animaux entiers symbiotiques (37/43) et des ovaires d'animaux symbiotiques (31/44). Au contraire, 30 gènes sur 37 affichent une tendance à la sur-expression au niveau des tissus immunitaires d'animaux symbiotiques (Tableau III-4). Seize gènes, dont le taux d'expression est significativement différent entre les animaux entiers ou les ovaires symbiotiques et asymbiotiques, ont été identifiés, 12 étant sous-exprimés et 4 sur-exprimés (Tableau III-4). Aucun différentiel d'expression significatif n'a été détecté dans les tissus immunitaires.

Parmi les gènes différentiellement exprimés, trois gènes sont impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes, la C-type lectine 1, la C-type lectine 2 et la C-type lectine 3. La C-type lectine 1 est sur-exprimée dans les ovaires alors que la C-type lectine 2 est sous-exprimée dans le même tissu. Quant à la C-type lectine 3, celle-ci est sous-exprimée dans l'animal entier. Ces C-type lectines ont pour principale fonction de se lier aux carbohydrates et sont impliquées dans la reconnaissance des agents pathogènes, dans l'opsonisation et l'encapsulation ainsi que dans la réponse

Tableau III-3 – Liste des gènes de l'immunité identifiés dans les différentes banques d'ADNc (modifié d'après Chevalier *et al.* (2012)).

		Fonctions biologiques	Gènes	Programmes BLAST	Numéro d'accèsion	Description	Espèces	e-value	Couverture	Identité max	Occurrence au sein des banques						
											SSH-C	SSH-NC	SSH-S	SSH-A	SO	AO	N
Détection des agents pathogènes	Reconnaissance	C-type lectin 1	blastx	ABAS4612.1	C-type lectin 1	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	5E-03	0,44	0,21								x
			tblastx	DQ871245.1	C-type lectin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	8E-09	0,27	0,48								
			blastx	ACR56805.1	C-type lectin	<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	1E-08	0,39	0,30					x	x		x
			tblastx	CP000576.1	Prochlorococcus marinus str. MIT 9301	<i>Prochlorococcus marinus</i>	9E-05	0,12	0,50								
			blastx	ACC86854.1	C-type lectin-like domain-containing protein PLP	<i>Portunus trituberculatus</i>	1E-09	0,74	0,27								x
			tblastx	EU477491.1	C-type lectin-like domain-containing protein PLP	<i>Portunus trituberculatus</i>	4E-14	0,56	0,65								
		Peroxinectin-like A	blastx	XP_002435528.1	Peroxinectin, putative	<i>Ixodes scapularis</i>	8E-27	0,85	0,32	x							x
			tblastx	XM_002406272.1	Peroxinectin, putative	<i>Ixodes scapularis</i>	1E-41	0,76	0,36								
		Peroxinectin-like B	blastx	XP_002406316.1	Peroxinectin, putative	<i>Ixodes scapularis</i>	7E-23	0,70	0,38	x							
			tblastx	EU934306.1	TSA: AD-573 salivary peroxi...	<i>Anopheles darlingi</i>	6E-23	0,52	0,48								
	Transduction	ECsIT	blastx	BAI40012.1	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	5E-43	0,58	0,59								x
			tblastx	AB491495.1	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	3E-51	0,63	0,60								
		MyD88-like	blastx	XP_001658635.1	Myd88	<i>Aedes aegypti</i>	4E-08	0,50	0,29								x
			tblastx	XM_001658585.1	Myd88	<i>Aedes aegypti</i>	4E-07	0,41	0,27								
		SOC52-like	blastx	BAI70368.1	suppressor of cytokine signaling-2 like	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	9E-35	0,81	0,47								x
			tblastx	AB516427.1	suppressor of cytokine signaling-2 like	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	2E-34	0,74	0,50								
Réponse immunitaire	Facteurs antimicrobiens	ALF 1	blastx	ABP73291.1	anti-lipopolysaccharide factor isoform 2	<i>Penaeus monodon</i>	2E-26	0,39	0,59								x
			tblastx	AB453738.1	MjALF2	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	8E-30	0,40	0,58								
		ALF 2	blastx	BAH22585.1	anti-lipopolysaccharide factor 2	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	2E-05	0,68	0,28	x							
			tblastx	AB453738.1	MjALF2	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	8E-19	0,79	0,40								
		Crustin 1	blastx	ACU25385.1	Crustin 4	<i>Panulirus japonicus</i>	5E-22	0,43	0,55								x
			tblastx	FJ797417.1	Crustin 1 (PjC1)	<i>Panulirus japonicus</i>	7E-24	0,47	0,58								
		Crustin 2	blastx	ACU25385.1	Crustin 4	<i>Panulirus japonicus</i>	1E-10	0,44	0,48								x
			tblastx	FJ797420.1	Crustin 1 (PjC1)	<i>Panulirus japonicus</i>	7E-34	0,35	0,66								
		Crustin 3	blastx	ACU25382.1	Crustin 1	<i>Panulirus japonicus</i>	2E-28	0,35	0,65								x
			tblastx	FJ797417.1	Crustin 1 (PjC1)	<i>Panulirus japonicus</i>	6E-34	0,44	0,53								
		I-type lysozyme	blastx	ACZ63472.1	i-type lysozyme-like protein 2	<i>Penaeus monodon</i>	7E-41	0,70	0,67								x
			tblastx	GQ478704.1	i-type lysozyme-like protein 2	<i>Penaeus monodon</i>	1E-42	0,57	0,62								
	Sérine protéases	Masquerade-like A	blastx	ABY64694.1	Masquerade-like protein	<i>Armadillidium vulgare</i>	2E-112	0,50	0,99	x							x
			tblastx	EU216755.1	Masquerade-like protein	<i>Armadillidium vulgare</i>	5E-134	0,50	0,99								
		Masquerade-like B	blastx	CAA72032.2	Masquerade-like protein	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	2E-86	0,67	0,47	x						x	x
			tblastx	EU216755.1	Armadillidium vulgare masquerade-like protein ...	<i>Armadillidium vulgare</i>	1E-97	0,37	0,75								
	Inhibiteurs de Sérine protéases	a2-macroglobulin A	blastx	ABY64692.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Armadillidium vulgare</i>	1E-119	0,99	1,00	x							x
			tblastx	EU216753.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Armadillidium vulgare</i>	6E-152	1,00	1,00								
		a2-macroglobulin B	blastx	AAX24130.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Penaeus monodon</i>	2E-06	0,28	0,54								x
			tblastx	DQ988330.2	alpha 2 macroglobulin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	2E-81	0,54	0,57								
		a2-macroglobulin C	blastx	ABI79454.2	alpha 2 macroglobulin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	6E-27	0,38	0,51						x		
			tblastx	AY826818.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Penaeus monodon</i>	1E-12	0,35	0,52								
		a2-macroglobulin D	blastx	BAC99073.1	alpha2-macroglobulin	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	1E-10	0,84	0,26								x
			tblastx	EF073268.2	alpha-2-macroglobulin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	4E-35	0,36	0,44								
		a2-macroglobulin E	blastx	ABK60046.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	5E-43	0,98	0,42	x							
			tblastx	EF073269.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	6E-64	0,97	0,48								
	Régulateur des sécrétions granulaires	Cyclophilin G	blastx	ADD18906.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	1E-62	0,72	0,71					x			
			tblastx	EZ543483.1	TSA: Crepidula fornicata 3374.Cfredg	<i>Crepidula fornicata</i>	7E-74	0,67	0,70								

CHAPITRE 3. CONSÉQUENCES DE LA SYMBIOSE À *WOLBACHIA* SUR L'EXPRESSION DE GÈNES DE L'IMMUNITÉ

ARNi	Piwi	blastx blastx	XP_002155913.1 XM_002155877.1	PREDICTED: similar to Crivi PREDICTED: similar to Crivi (LOC100201838)	<i>Hydra magnipapillata</i> <i>Hydra magnipapillata</i>	2E-93 4E-105	0.73 0.73	0.51 0.64	x	x	x
Réponse au stress	Argonaute-like	blastx	NP_001181904.1 XM_001638444.1	argonaute-2 predicted protein (MENVEDRAFT_v1.g180719)	<i>Sus scrofa</i> <i>Nematostella vectensis</i>	6E-55 3E-56	0.97 0.84	0.50 0.47	x		
	Ferritin A	blastx blastx	ABY75225.1 EU371046.1	Ferritin Ferritin	<i>Macrobachium rosenbergii</i> <i>Macrobachium rosenbergii</i>	4E-67 4E-60	0.47 0.48	0.74 0.75	x	x	x
	Ferritin B	blastx blastx	ABY75225.1 EU371046.1	Ferritin Ferritin	<i>Macrobachium rosenbergii</i> <i>Macrobachium rosenbergii</i>	2E-50 2E-59	0.66 0.77	0.57 0.58	x	x	x
	Ferritin C	blastx blastx	ABY75225.1 EU371046.1	Ferritin Ferritin	<i>Macrobachium rosenbergii</i> <i>Macrobachium rosenbergii</i>	3E-58 4E-68	0.72 0.74	0.69 0.80			x
Détoxification	BIP2	blastx blastx	XP_001687763.1 XM_002428865.1	AGA-P00188-PA (Anopheles gambiae str. PEST) conserved hypothetical protein	<i>Anopheles gambiae</i> <i>Pedicularis humanus</i>	7E-52 1E-59	0.60 0.51	0.46 0.57	x	x	x
	Peroxioredoxin A	blastx blastx	ACS91344.1 GQ161914.1	Peroxioredoxin Peroxioredoxin	<i>Femmeropneus indicus</i> <i>Femmeropneus indicus</i>	3E-56 1E-117	0.81 0.82	0.56 0.85	x		x
	Peroxioredoxin B	blastx blastx	ACT36539.1 EU636070.1	Peroxioredoxin 6 Peroxioredoxin 6	<i>Eriocher sinensis</i> <i>Eriocher sinensis</i>	1E-79 4E-95	0.68 0.68	0.63 0.65	x		x
	Peroxioredoxin C	blastx blastx	AAP93584.1 NM_001030437.1	thioredoxin peroxidase thioredoxin	<i>Apis mellifera ligustica</i> <i>Xenopus tropicalis</i>	8E-78 4E-92	0.76 0.77	0.78 0.76		x	
	Peroxioredoxin-like D	blastx blastx	XP_970660.2 XM_995567.2	PREDICTED: similar to 1-Cys peroxiredoxin PREDICTED: similar to 1-Cys peroxiredoxin	<i>Tribolium castaneum</i> <i>Tribolium castaneum</i>	5E-07 1E-09	0.51 0.59	0.70 0.66	x		
	Thioredoxin A	blastx blastx	XP_001608075.1 XM_001608025.1	Thioredoxin-like protein Thioredoxin-like protein	<i>Nasonia vitripennis</i> <i>Nasonia vitripennis</i>	2E-73 2E-84	0.88 0.88	0.60 0.64	x	x	x
	Thioredoxin B	blastx blastx	XP_973267.1 XM_968174.1	PREDICTED similar to Thioredoxin domain-containing protein 14 homolog (LThioredoxin domain-containing protein 14 homolog)	<i>Tribolium castaneum</i> <i>Tribolium castaneum</i>	4E-58 3E-63	0.96 0.91	0.53 0.60	x	x	x
	Glutathione peroxidase	blastx blastx	AAV68814.1 EU399681.1	selenium dependent salivary glutathione peroxidase Glutathione peroxidase	<i>Lyodes scapularis</i> <i>Macropneustes erias</i>	3E-39 5E-36	0.95 0.71	0.43 0.57		x	x
	Cu/Zn SOD	blastx blastx	ABU55006.1 EU071527.1	Copper/zinc superoxide dismutase Copper/zinc superoxide dismutase	<i>Macrobachium rosenbergii</i> <i>Macrobachium rosenbergii</i>	1E-30 9E-32	0.43 0.31	0.47 0.71	x		x
	cytW5OD	blastx blastx	CAR85669.1 FN242568.1	cytoplasmic manganese superoxide dismutase cytoplasmic manganese superoxide dismutase	<i>Cyanagracea praedator</i> <i>Cyanagracea praedator</i>	2E-102 8E-116	0.68 0.68	0.66 0.73	x		x
Coagulation	Transglutaminase B	blastx blastx	AAK69205.1 AF336805.1	Transglutaminase Transglutaminase	<i>Pacificastacus leniusculus</i> <i>Pacificastacus leniusculus</i>	3E-70 8E-84	0.78 0.78	0.54 0.60	x		x
Differentiation cellulaire	Astakine	blastx blastx	ACI02322.1 EU980445.1	astakine variant 2 astakine variant 2	<i>Penaeus monodon</i> <i>Penaeus monodon</i>	3E-11 7E-15	0.64 0.72	0.52 0.49			x
Apoptose	Runt	blastx blastx	CJD44571.1 AJ50896.1	runt protein 1b Pacifastacus leniusculus mRNA for runt protel...	<i>Pacifastacus leniusculus</i> <i>Pacifastacus leniusculus</i>	2E-45 8E-73	0.67 0.65	0.65 0.62		x	
Apoptose	AIF-like	blastx blastx	NP_001121885.1 NM_001128413.1	apoptosis-inducing factor apoptosis-inducing factor	<i>Danio rerio</i> <i>Danio rerio</i>	7E-28 9E-30	0.54 0.52	0.43 0.49			x
Autophagie	ATG7	blastx blastx	XP_002600056.1 NM_001129922.1	hypothetical protein BRAF-DRAFT_79469 ATG7 autophagy related 7 homolog	<i>Branchiostoma floridae</i> <i>Xenopus tropicalis</i>	2E-40 5E-40	0.88 0.68	0.52 0.61	x		
Autophagie	ATG12	blastx blastx	ADO32986.1 HM449861.1	Autophagy-like protein ATG12 Autophagy-like protein ATG12	<i>Biston betularia</i> <i>Biston betularia</i>	3E-33 1E-38	0.50 0.47	0.52 0.53		x	
Cytosquelette	Kinesin	blastx blastx	NP_999817.1 NM_214652.1	kinesin II kinesin II	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	3E-159 0E+00	0.81 0.82	0.83 0.40	x		x

antivirale (Ao *et al.* 2007 ; Zelensky et Gready 2005). Ces protéines sont également impliquées dans les interactions symbiotiques : les C-type lectines sont ainsi nécessaires dans l'acquisition du symbiote chez le corail *Acropora millepora* (Kvennefors *et al.* 2008) et chez le nématode marin *Laxus oneistus* (Bulgheresi *et al.* 2006). Chez *Ae. aegypti* et *An. gambiae* transfectés avec la souche virulente *wMelPop*, les C-type lectines sont sur-exprimés (Kambris *et al.* 2010 ; Moreira *et al.* 2009). Chez *A. vulgare*, ces trois C-type lectines ont un patron d'expression tissulaire différent suggérant qu'elles auraient des rôles différents.

Trois gènes codant des peptides antimicrobiens sont sous-exprimés : les gènes codant l'armadillidine et l'i-type lysozyme au niveau des animaux entiers et le gène codant la crustine 3 à la fois dans les animaux entiers et dans les ovaires. L'armadillidine et les crustines sont des peptides antimicrobiens dirigés contre les bactéries Gram(+) (Herbinière *et al.* 2005 ; Smith *et al.* 2008). L'impact de *Wolbachia* sur l'expression de gènes codant des peptides antimicrobiens varie selon les différentes associations hôtes/*Wolbachia*. Chez *D. simulans*, *Ae. albopictus* (Bourtzis *et al.* 2000) et dans la lignée cellulaire de vers à soie (Nakamura *et al.* 2011), *Wolbachia* ne perturbe pas l'expression de ce type de gène. En revanche, dans la lignée S2 de *D. melanogaster*, ces gènes sont sous-exprimés en présence de la bactérie (Xi *et al.* 2008). Chez les moustiques *Ae. aegypti* et *An. gambiae* transfectés avec la souche *wMelPop*, des gènes codant des peptides antimicrobiens se trouvent sur-exprimés (Bian *et al.* 2010 ; Kambris *et al.* 2010 ; Moreira *et al.* 2009). Dans les modèles *A. tabida*/*Wolbachia* et *S. oryzae*/SPE, ces gènes sont sous-exprimés (Kremer *et al.* soumis ; Vigneron *et al.* soumis). Chez *A. vulgare*, cette sous-expression pourrait être mise en relation avec la septicémie naturelle plus importante mise en évidence chez les animaux infectés par *Wolbachia* (Braquart-Varnier *et al.* 2008).

Trois gènes impliqués dans la détoxification, la peroxyrédoxine A et C et la glutathione peroxydase, sont sous-exprimés dans les ovaires alors que la thiorédoxine A est sur-exprimée dans le même tissu. Les complexes d'enzymes impliqués dans la dé-

CHAPITRE 3. CONSÉQUENCES DE LA SYMBIOSE À *WOLBACHIA* SUR L'EXPRESSION DE GÈNES DE L'IMMUNITÉ

Tableau III-4 – Expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire d'*A. vulgare*. Les transcrits des gènes sont quantifiés par RT-qPCR et normalisés par l'expression de deux gènes de référence codant la protéine ribosomique L8 (RbL8) et le facteur d'élongation 2 (EF2). Le ratio d'expression entre les conditions symbiotique et asymbiotique a été calculé pour chaque échantillon (F = femelle entière, Ov = ovaire, TI = tissus immunitaire). La sur-expression et la sous-expression dans les échantillons symbiotiques sont respectivement en italique et en gras (* p<0,05 ; ** p<0,001 ; - expression non quantifiable) (modifié d'après Chevalier *et al.* (2012)).

Fonctions biologiques		Gènes	ratio Symbiotique/Asymbiotique		
			F	Ov	TI
Détection des agents pathogènes	Reconnaissance	C-type lectin 1	1,19	3,42**	1,55
		C-type lectin 2	0,90	0,30**	-
		C-type lectin 3	0,47*	-	1,06
		Peroxinectin-like A	0,93	0,09	2,03
		Peroxinectin-like B	0,72	0,93	2,03
Transduction	ECSIT	1,44	0,63	1,48	
	MyD88-like	0,86	0,78	1,45	
	SOCS2-like	-	0,72	1,44	
Réponse immunitaire	Facteurs antimicrobiens	ALF 1	0,77	0,57	0,68
		ALF 2	0,90	2,50	1,42
		Armadillidine	0,44**	0,83	0,95
		Crustin 1	0,57	-	-
		Crustin 2	0,77	0,48	-
		Crustin 3	0,50**	0,47**	-
		i-type lysozyme	0,63**	0,44	1,77
	Sérine protéases	Masquerade-like A	0,41	1,30	1,18
		Masquerade-like B	0,36*	0,33	-
	Inhibiteurs de Sérine protéases	α ₂ -macroglobulin A	0,95	1,03	1,05
		α ₂ -macroglobulin B	0,80	0,83	1,21
		α ₂ -macroglobulin C	0,68	0,32**	0,74
		α ₂ -macroglobulin D	0,56	1,88	1,47
		α ₂ -macroglobulin E	1,44	1,68	3,05
	Régulateur des sécrétions granulaires	Cyclophilin G	0,94	0,74	1,31
	ARNi	Piwi	0,95	0,74	-
		Argonaute-like	0,98	0,62	1,31
	Réponse au stress/Détoxification	Ferritin A	0,95	2,32*	1,71
		Ferritin B	0,79	0,67	-
		Ferritin C	0,84	1,90**	1,65
		BIP2	0,86	0,57	1,23
		Peroxiredoxin A	0,45	0,39	1,59
		Peroxiredoxin B	0,58	0,44**	1,05
Peroxiredoxin C		-	0,02**	-	
Peroxiredoxin-like D		0,71	1,16	0,53	
Thioredoxin A		1,59	1,91**	2,13	
Thioredoxin B		0,57	1,17	0,73	
Glutathione peroxidase		0,82	0,17**	1,09	
Cu/Zn SOD		0,45	0,68	1,12	
cytMn SOD		0,65	0,77	1,66	
Coagulation	Transglutaminase A	0,75	2,67	1,95	
	Transglutaminase B	1,33	1,99	1,77	
Différenciation cellulaire	Astakine	0,98	0,49	2,08	
	Runt	1,40	0,83	1,69	
Apoptose	AIF-like	-	0,59	-	
Autophagie	atg7	0,73	0,53**	0,59	
	atg12	0,92	0,27*	0,69	
Autre	Cytosquelette	Kinesin	0,94	0,34	1,35
			S > A	S < A	

S > A

S < A

toxification sont nécessaires à la réduction des ROS et sont importants pour limiter les dommages causés lors du stress oxydant (péroxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques). Au sein de notre système symbiotique, les gènes codant des enzymes de détoxification sont sous-exprimés uniquement dans les ovaires. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus en lignée cellulaire S2 de drosophile infectée par *Wolbachia* (Xi *et al.* 2008) et chez *A. tabida* (Kremer *et al.* soumis). Cette sous-expression pourrait être une réaction du tissu ovarien pour limiter la croissance des bactéries. Concernant la thiorédoxine, la sur-expression de ce gène pourrait être une réponse à la sous-expression des gènes précédents ou pourrait être induite par *Wolbachia* afin de réduire l'apoptose et d'accélérer la multiplication des cellules gonadiques. En effet, chez la souris, cette protéine donneuse d'électron agit indirectement ou directement sur la réduction des ROS mais aussi sur la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Yoshida *et al.* 2005).

Parmi les gènes impliqués dans la réponse au stress, les gènes codant les ferritines A et C sont sur-exprimés dans les ovaires. Les ferritines sont d'importantes protéines de séquestration du fer et jouent un rôle crucial dans le système de défense basé sur la privation de fer (Ong *et al.* 2006). Durant une infection, l'hôte peut séquestrer le fer pour limiter la croissance des micro-organismes. Cette sur-expression des ferritines pourrait être une réponse de la cellule afin de priver *Wolbachia* de fer entraînant une limitation de sa croissance. Par ailleurs, cette sur-expression pourrait aussi être le résultat de la sous-expression de gènes codant des enzymes de détoxification (péroxyrédoxines B et C et glutathione peroxydase). Parce que le fer libre intracellulaire produit des ROS selon la réaction de Fenton en présence de H_2O_2 , la séquestration du fer pourrait réduire cette production afin d'éviter tout effet délétère au niveau cellulaire. Ce résultat est à l'opposé de ceux obtenu dans le système *A. tabida*/*Wolbachia* dans lequel les gènes codant la ferritine sont sous-exprimés en présence de la bactérie (Kremer *et al.* 2009). Cette sous-expression pourrait être due au phénotype de dépendance d'*A. tabida* vis-à-vis de la bactérie, cette dernière

étant nécessaire à l'ovogenèse, alors que dans notre modèle cette même bactérie est facultative et n'interfère pas avec l'ovogenèse.

Concernant l'autophagie, deux gènes, *atg7* et *atg12*, sont sous-exprimés dans les ovaires. L'autophagie a été initialement identifiée comme un mécanisme d'autodigestion globale pour le recyclage des protéines et des organelles. Chez *D. melanogaster*, elle peut être induite *via* le PGRP-LE, essentiel à la reconnaissance de bactéries intracellulaires telles que *L. monocytogenes* (Yano et Kurata 2008), suggérant que ce processus biologique est aussi impliqué dans l'immunité innée. Chez *A. tabida* et *S. oryzae*, les gènes associés à l'autophagie sont également sous-exprimés en présence du symbiote (Kremer *et al.* soumis ; Vigneron *et al.* soumis). Ce processus semble donc critique dans les symbioses bactériennes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette sous-expression pourrait être issue d'une manipulation active de la part de *Wolbachia* pour réduire son élimination de la cellule hôte.

Enfin, un gène codant une sérine protéase, la masquerade-like B, est aussi sous-exprimé dans les animaux entiers. Ce type de protéines est impliqué dans diverses fonctions biologiques comme la reconnaissance d'agents pathogènes, l'opsonisation, l'adhésion cellulaire (Lee et Söderhäll 2001), et la réponse antivirale (Sriphajit *et al.* 2007). Dans notre système, cette sous-expression pourrait potentiellement modifier ces fonctions.

2.3 Conclusion

Les résultats obtenus au cours de l'ANR EndoSymbArt, et particulièrement lors de la quantification d'expression de gènes de l'immunité, ont permis de mettre en évidence à la fois une tendance générale d'expression de gènes mais également quelques gènes différentiellement exprimés en présence de *Wolbachia*. Bien qu'une tendance à la sur-expression soit nettement visible dans les tissus immunitaires, aucun gène n'est significativement différentiellement exprimé. Trois hypothèses non exclusives peuvent expliquer cette situation : (i) le manque de profondeur de séquençage de

l'ensemble des banques ne permettant pas d'identifier des gènes différentiellement représentés, (ii) le fait que les différentes banques aient été construites soit à partir d'ovaires soit à partir d'animaux entiers diluant ainsi les ARNm des gènes différentiellement exprimés propre au système immunitaire ou alors (ii) le fait que ces gènes se révèlent différentiellement exprimés en présence de *Wolbachia* uniquement en réponse à une infection par un agent pathogène (les banques SSH d'animaux infectés par un agent pathogène ont été réalisées uniquement avec des animaux asymbiotiques). Pour mettre en évidence des variations d'expression de ces gènes, une nouvelle approche transcriptomique va être réalisée dans le cadre d'un nouveau projet ANR : l'ANR ImmunSymbArt.

3 ANR ImmunSymbArt (2010–2013) : une nouvelle approche focalisée sur le système immunitaire

Le projet ImmunSymbArt (*imm*unité et *sym*biose chez les *arth*ropodes, coord. D. Bouchon), qui est un prolongement du projet EndoSymbArt, est centré sur les interactions entre les symbiotes et l'immunité de leur hôte. Il repose en grande partie sur une approche transcriptomique faisant appel aux nouvelles techniques de séquençage : le RNA-Seq. Cette méthode permet à la fois d'avoir un aspect qualitatif (identification de nouveaux EST) mais aussi quantitatif (fréquence de chaque EST). Ceci devrait permettre d'enrichir le répertoire de gènes immunitaires déjà identifiés, potentiellement ceux manquant dans les voies précédemment citées, mais surtout d'avoir accès directement à leur expression quantitative.

Plus globalement, ce projet vise à comprendre les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le maintien et le contrôle de la symbiose. Toutefois, ce nouveau projet se focalise plus particulièrement sur la réponse immunitaire globale des hôtes arthropodes et inclus les relations hôte/symbiote dans un contexte infectieux faisant intervenir un agent pathogène comme troisième partenaire. Les modèles uti-

lisés comprennent les trois précédents (*A. tabida*/*Wolbachia*, *S. oryzae*/*SPE*, *A. vulgare*/*Wolbachia*) ainsi que deux nouveaux modèles (*D. melanogaster*/*Wolbachia* et *Ae. albopictus*/*Wolbachia*).

3.1 Réalisation de banques d'ADNc du système immunitaire et d'animaux entiers infectés par des agents pathogènes

L'une des approches majeures prévue dans ce projet est une approche transcriptomique à large échelle, permise par les nouvelles technologies de séquençage, telle que le RNA-Seq. Pour cette approche, j'ai réalisé 16 banques d'ADNc (Tableau III-5) : trois banques d'ADNc de tissus immunitaires (animaux asymbiotiques et symbiotiques infectés par les souches *wVulC* et *wVulM*) et leur réplicat technique, de la même façon trois banques d'ADNc d'ovaires et leur réplicat technique, deux banques d'ADNc d'animaux entiers asymbiotiques et symbiotiques infectés par différentes bactéries pathogènes et deux banques d'ADNc d'animaux entiers symbiotiques et asymbiotiques injectés avec uniquement du milieu de culture stérile.

Tableau III-5 – Ensemble des banques du projet ImmunSymbArt. F = femelles entières, TI = tissus immunitaires, Ov = ovaires, S = symbiotique, A = asymbiotique, C = injection de différentes bactéries pathogènes, NC = injection de milieu de culture.

	Nom	Souche	Tissus	Statut de symbiose	Statut d'infection	Nombre de banques
Réponse de l'hôte aux bactéries pathogènes	CA	-	F	A	C	1
	NCA	-	F	A	NC	1
	CS	<i>wVulC</i>	F	S	C	1
	NCS	<i>wVulC</i>	F	S	NC	1
Réponse de l'hôte au symbiote	TIA	-	TI	A	-	2
	TISc	<i>wVulC</i>	TI	S	-	2
	TISm	<i>wVulM</i>	TI	S	-	2
	OA	-	Ov	A	-	2
	OSc	<i>wVulC</i>	Ov	S	-	2
	OSm	<i>wVulM</i>	Ov	S	-	2

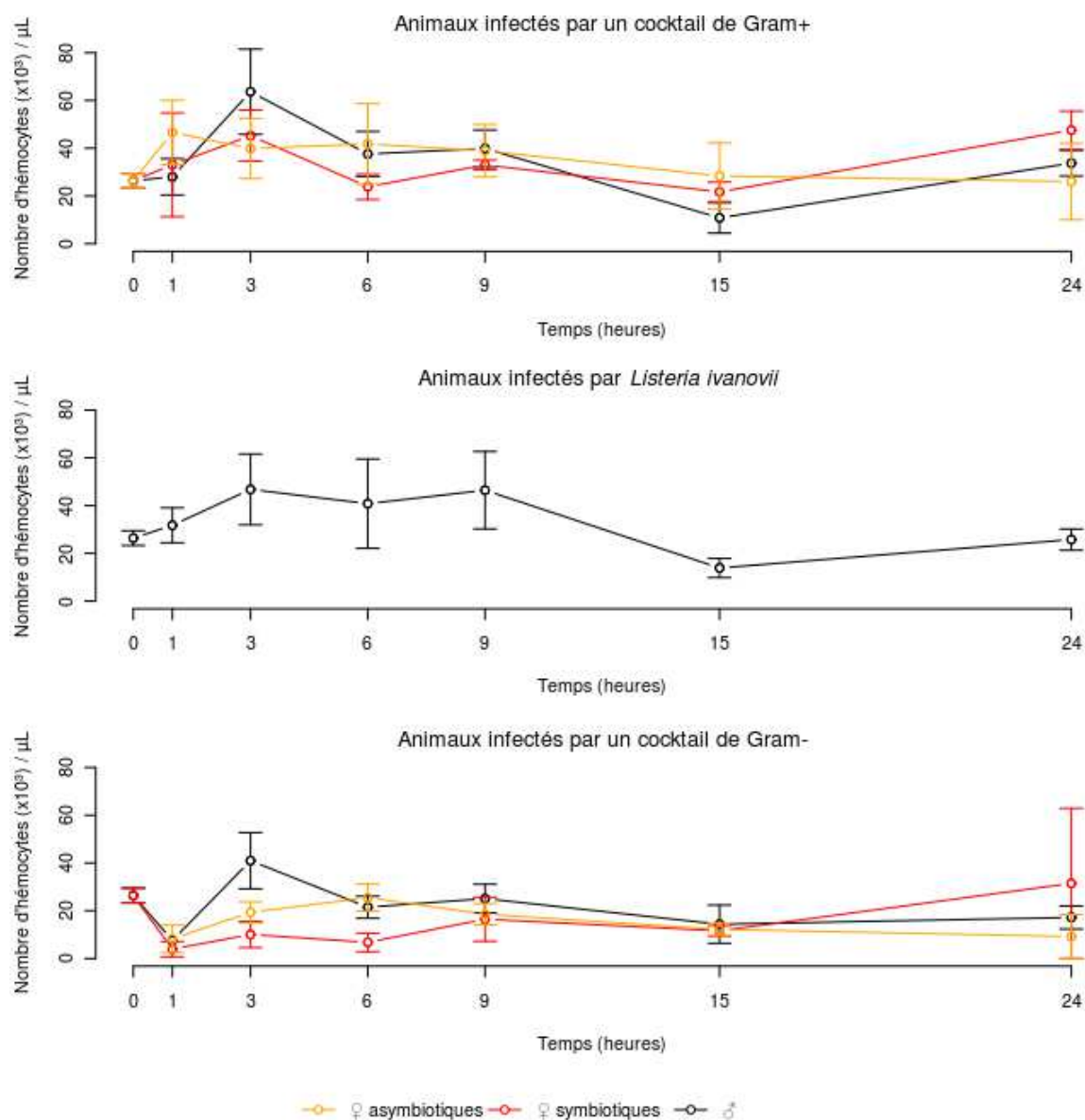


FIGURE III-21 – Evolution du THC sur une période de 24h chez les femelles symbiotiques et asymbiotiques ainsi que chez des mâles infectés avec un cocktail de Gram(+), de Gram(-) ou avec *L. ivanovii*.

Chaque banque d'ADNc d'animaux entiers infectés a été construite à partir d'ARN issus de trois types d'infections indépendantes : des infections réalisées avec un cocktail de bactéries Gram(+) (*Micrococcus luteus* et *S. lugdunensis*), des infections réalisées avec un cocktail de bactéries Gram (−) (*E. coli* et *V. alginolyticus*) et des infections réalisées avec *L. ivanovii*. Pour chacune de ces infections, les ARN ont été extraits 1h, 3h et 9h après l'injection des bactéries dans l'animal. Pour chaque temps, les ARN issus de chaque infection ont été mélangés proportionnellement au nombre d'espèces bactériennes utilisées pour l'injection. Les trois mélanges qui en résultent, correspondant aux trois temps de prélèvement, sont à leur tour mélangés pour constituer le pool d'ARN permettant la réalisation de la banque d'ADNc.

Le processus d'infection des animaux a demandé certaines mises au point quant au nombre de bactéries injectées et aux temps de prélèvement des ARN après injection et ce afin d'avoir un aperçu global de la réponse immunitaire. Les concentrations de bactéries ont été déterminées à partir des résultats obtenus lors des infections précédentes (cf. chapitre 2 § 2.1, page 101), soit 10^5 bactéries. μL^{-1} pour chacune des souches et 10^3 bactéries. μL^{-1} pour *V. alginolyticus*. Ces doses bactériennes, qui ne sont pas mortelles durant les premières heures de l'infection, nous ont permis de maintenir vivants des animaux jusqu'à 24h post-injection. Les temps de prélèvement ont été déterminés par le suivi du THC au cours de la réponse immunitaire chez des femelles symbiotiques et asymbiotiques ainsi que chez des mâles. En effet, ce critère correspondrait à différentes phases de la réponse immunitaire chez les crustacés (Söderhäll *et al.* 2005). Les temps de 1h, 3h, 9h et 24h post-injection correspondent aux points où nous avons observés d'importantes variations dans le THC (Figure III-21). Le point 24h devait initialement être utilisé pour la réalisation des banques mais une mortalité des femelles asymbiotiques infectées par *L. ivanovii* ne nous a pas permis de l'exploiter.

3.2 Acquisition et traitement des données

L'ensemble des banques a été séquencé toujours dans le cadre du projet Génoscope *Immune Genomics in Invertebrate Endosymbiosis*. Ce séquençage a été réalisé selon les technologies de séquençage très haut débit Illumina/Solexa qui permet de séquencer de façon massive et en parallèle des fragments d'ADN de l'ordre de 76 paires de bases en moyenne. Cette technique de part sa sensibilité permettra d'avoir un aspect quantitatif de l'expression de gènes (fréquence des différents EST) et qualitatif (EST inédits séquencés) ainsi qu'une profondeur de séquençage supérieure à celle des banques EndoSymbArt.

L'ensemble des données brutes obtenus se chiffre à 128 Go (soit ~ 8 Go par banque). L'assemblage des EST se fera par une méthode *de novo*. A l'aide de données transcriptomiques acquises sur le modèle *D. melanogaster* dans le cadre de cet ANR, cette méthode a été récemment validée en comparaison d'une méthode par cartographie sur génome (travail de Delphine Charif et Marie-Christine Carpentier, Laboratoire BBE, UMR CNRS 5558, Université de Lyon). La méthode *de novo* consiste à assembler les EST uniquement sur la base de leur recouvrement mutuel alors que la cartographie sur génome consiste à assembler les EST par rapport aux transcrits que l'on peut extraire d'un génome. Cette méthode *de novo* nous permettra de surmonter l'absence de génome de référence chez les isopodes. L'analyse des unigènes ainsi assemblés mettra en évidence les voies perturbées en présence de *Wolbachia* au niveau du système immunitaire ainsi que lors d'infection au niveau de l'animal entier.

4 Conclusion et perspectives

La quantification d'expressions de gènes au sein d'animaux entiers, d'ovaires et de tissus immunitaires ont permis de mettre en évidence un ensemble de gènes dont l'expression est perturbée en présence de *Wolbachia*. Étonnamment, les gènes testés

sont globalement sur-exprimés dans le système immunitaire alors que la tendance est inverse dans les ovaires et à l'échelle de l'animal entier. Dans l'hypothèse d'une manipulation directe ou indirecte de l'expression de ces gènes par *Wolbachia*, ceci pourrait être une stratégie de la bactérie, sélectionnée au cours de l'évolution, pour être tolérée au sein de l'organisme (animal entier) et particulièrement des organes symbiotiques par lesquels s'effectue la transmission verticale (ovaires) tout en augmentant l'expression de ces mêmes gènes liés à l'immunité dans le système immunitaire afin de compenser une baisse de certains paramètres immunitaires, le THC et l'activité PO quantifiée précédemment (cf. chapitre 2 § 2.1 page 101). Il se pourrait également que la présence de *Wolbachia* stimule « involontairement » le système immunitaire, ce dernier détectant un intrus et tentant de mettre en place une réponse immunitaire sans pouvoir l'éliminer. Cette stimulation pourrait participer à l'immunoprotection apportée par *Wolbachia* lors d'une infection par *L. ivanovii* chez *A. vulgare*, comme cela a été suggéré dans les modèles *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* et *An. gambiae* transfectés avec la souche *wMelPop* (Bian *et al.* 2010 ; Kambris *et al.* 2009, 2010 ; Moreira *et al.* 2009).

Cependant, l'expression des gènes pouvant être impliqués dans la modification du THC et de l'activité PO ne semble pas expliquer les résultats obtenus sur ces paramètres immunitaires. En effet, les gènes *runt* et *astakine* impliqués dans l'hématopoïèse semblent sur-exprimés au niveau du système immunitaire et n'expliquent donc pas la chute du THC. Le gène *masquerade-like A* potentiellement impliqué dans l'activation de la cascade PO semblent lui aussi sur-exprimé et ne peut donc pas expliquer la chute de l'activité PO. Toutefois, comme nous pouvons le voir, l'accroissement du nombre de gènes identifiés par l'approche transcriptomique de l'ANR EndoSymbArt reste assez limité. Par conséquent, les gènes testés ne nous donnent qu'une vision très parcellaire des perturbations au niveau transcriptionnel qui pourrait toucher les différentes voies immunitaires.

Cette vision pourra être très largement complétée par les nouvelles banques réa-

lisées au cours de l'ANR ImmunSymbArt. En effet, la quantité de données acquises entre les deux projets ANR est passée de 8 Go à 128 Go, autrement dit a été multipliée par 16. De plus, la nouvelle approche transcriptomique par RNA-Seq nous permettra d'avoir des données quantitatives relativement précises sur les gènes impliqués dans les différentes voies de l'immunité. Ainsi, l'identification de voies particulières perturbées en présence de *Wolbachia* dans un système immunitaire non stimulé ou stimulé par une infection permettra d'avoir une vision d'ensemble de l'impact de la symbiose sur l'immunité et de peut-être identifier certains gènes clés dans l'interaction hôte/*Wolbachia*. Enfin l'accroissement des données transcriptomiques devrait nous permettre d'identifier de nouveaux EST complétant le répertoire de gènes des différentes voies amorcé avec l'ANR EndoSymbArt.

Pour l'heure, l'ANR EndoSymbArt a toutefois permis de mettre en évidence de nombreux gènes liés à l'immunité sur- ou sous-exprimés dans l'organe symbiotique que constitue l'ovaire. Ces gènes jouent probablement un rôle important dans le maintien du symbiote dans cet organe puisque ces derniers codent des protéines potentiellement présentes dans la cellule qu'occupe la bactérie. Cependant, aucune relation directe entre le taux d'expression du gène et la présence de la bactérie dans la cellule n'a pu être mise en évidence. Une approche par FISH permettrait de corrélérer le taux d'expression d'un gène (correspondant à l'intensité de fluorescence d'une sonde ciblant l'ARNm de ce gène) en fonction de la présence ou de l'absence de la bactérie. Cette corrélation serait en faveur de l'hypothèse d'une action directe ou indirecte de *Wolbachia* sur l'expression de gènes au sein de sa cellule hôte. Il s'agit ici du travail de thèse débuté par Lise Genty sous la direction de J. Bertaux et D. Bouchon.

Quatrième partie

Discussion générale

La présence de *Wolbachia* au sein des cellules d'*A. vulgare* et plus particulièrement au sein des cellules immunitaires a un impact sur plusieurs aspects de l'immunité de son hôte. Tout d'abord, au niveau cellulaire, bien qu'aucune différence structurelle des trois types d'hémocytes n'ait été observée en présence de la bactérie, des impacts sur le THC, la proportion d'hémocytes granulaires ainsi que sur la proportion des événements apoptotiques des hémocytes circulants ont été quantifiés. La présence de la bactérie a aussi une incidence significative sur une activité enzymatique très importante chez les Invertébrés : l'activité PO. Ainsi, comparées aux femelles asymbiotiques, les femelles symbiotiques âgées de un an présentent une proportion d'hémocytes granulaires, une proportion de phénomènes apoptotiques hémocytaires et une activité PO moins importantes. De plus, nous avons pu mettre en évidence que la présence de *Wolbachia* a un impact majeur sur le vieillissement des individus. En effet, à l'âge de deux ans, la chute du THC et de l'activité PO est accentuée par rapport à la chute observée chez les femelles asymbiotiques. En revanche, à cet âge, il n'y a pas d'évolution significative de la proportion des phénomènes apoptotiques, ces derniers étant toujours inférieurs chez les femelles symbiotiques comparées aux femelles asymbiotiques. L'immunocompétence semble elle aussi perturbée par la présence de *Wolbachia* mais contrairement aux précédentes observations, cet impact pourrait être positif. En effet, les femelles symbiotiques âgées de un an possèdent une meilleure immunocompétence suite à une infection par la bactérie intracellulaire *L. ivanovii*. Enfin la présence de la bactérie semble induire une sur-expression des gènes liés à l'immunité au sein des tissus immunitaires (hémocytes et organes hématopoïétiques). Ces résultats pourront être confirmés par l'approche RNA-Seq dont les données à la fois qualitative et quantitative devrait nous permettre de révéler les gènes impliqués plus largement dans les interactions *A. vulgare*/*Wolbachia*.

Parmi l'ensemble de ces données, certaines sont encore manquantes chez les individus de deux ans et devront par conséquent être complétées, principalement sur

la quantification de la proportion d'hémocytes granulaires ainsi que sur l'effet protecteur de l'endosymbiote contre *L. ivanovii*.

L'ensemble de ce travail a donc permis d'obtenir une vision de l'impact de la présence de *Wolbachia* sur l'immunité et l'immunocompétence de son hôte *A. vulgare* à l'âge de un an et de deux ans. Les défenses immunitaires des femelles semblent amoindries en présence de la bactérie alors que l'immunocompétence pourrait être augmentée. Bien que ce dernier point reste à étayer, ceci soulève la question de l'origine de cette protection : la tendance à la sur-expression des gènes dans les tissus immunitaires chez les animaux symbiotiques permettraient-elle d'expliquer cette possible hausse de l'immunocompétence en compensant en partie la baisse des différents paramètres immunitaires ? D'autres paramètres immunitaires seraient-ils stimulés en présence de l'endosymbiote ?

Une autre question se pose à la vue des résultats sur les différents paramètres immunitaires testés : la diminution des défenses immunitaires est-elle nécessaire au maintien de *Wolbachia* ou n'est-elle qu'un effet collatéral de l'interaction de la bactérie avec son hôte ? D'autre part, la baisse générale des différents paramètres immunitaires serait-elle due à une interconnexion de ces derniers ? En effet, la diminution de la proportion d'hémocytes granulaires pourrait être directement reliée à la réduction de l'activité PO, au moins à l'âge de un an, ce qui pourrait avoir comme conséquence rétroactive l'accentuation de la chute du THC observée chez les femelles symbiotiques âgées de deux ans.

L'étude de l'impact de *Wolbachia* sur les paramètres immunitaires se poursuivra en premier lieu par la quantification de deux autres paramètres immunitaires susceptibles d'être perturbés : la production de ROS et l'autophagie. En effet, les gènes impliqués dans ces voies présentent des différentiels d'expression significatifs au niveau des animaux entiers et des ovaires. Ces voies pourraient par conséquent

être impliquées dans l'interaction entre l'hôte et l'endosymbiote d'autant plus que la production de ROS ou l'autophagie sont des phénomènes intracellulaires qui peuvent être dirigés contre la bactérie. D'autre part, l'analyse des données transcriptomiques issues de l'approche RNA-Seq devrait conduire à l'identification d'autres voies perturbées et devrait ainsi nous aiguiller sur de nouveaux paramètres immunitaires à quantifier.

L'augmentation de l'immunocompétence en présence de *Wolbachia* lors d'une infection par *L. ivanovii* pourrait ne pas être limitée à cette bactérie et sera testée avec d'autres agents pathogènes. La mise en évidence d'un tel phénotype de protection pourra être facilitée par l'utilisation d'un variant virulent de *wVulC* sélectionné au laboratoire. En effet, les récents travaux de thèse de Winka Le Clec'h (direction M. Sicard et D. Bouchon) ont permis de sélectionner cette souche suite à la transmission répétée de bactéries de manière exclusivement horizontale. Cette souche virulente pourrait potentiellement exacerber le phénotype de protection observée lors d'une infection par *L. ivanovii* et peut-être mettre en évidence d'autres phénomènes de protection. Cette confirmation pourra être menée par l'injection de bactéries pathogènes à des individus porteurs de cette souche virulente ou par la co-injection bactéries pathogènes/souche virulente permettant de mettre en évidence des phénomènes de compétition.

Par ailleurs, ces études à l'échelle individuelle devront être menées à l'échelle populationnelle afin d'observer si cet effet protecteur potentiel de *Wolbachia* est conservé, ce qui pourrait ainsi expliquer en partie son maintien dans ces populations naturelles. Ces études peuvent être menées *via* la mise en place de mésocosmes, c'est-à-dire d'environnements reconstitués dont les paramètres sont contrôlés et accueillant quelques dizaines d'individus. L'introduction d'individus malades dans ces mésocosmes permettra de tester le taux de transmission des agents pathogènes ainsi que la mortalité des individus dans des populations symbiotiques et asymbiotiques.

Les effets sur les paramètres immunitaires et l'immunocompétence d'*A. vulgare*

mettent en évidence, pour la première fois, l'impact d'une souche féminisante sur le système immunitaire de son hôte. En effet, les perturbations de l'immunocompétence observés chez les drosophiles (Fytrou *et al.* 2006 ; Hedges *et al.* 2008 ; Teixeira *et al.* 2008) sont dues à la présence de souches de *Wolbachia* induisant une incompatibilité cytoplasmique (IC). Nous pouvons donc nous interroger sur la relation entre phénotype lié à la reproduction et phénotype lié à l'immunité chez les différentes souches de *Wolbachia*. Chez les isopodes, des souches induisant le phénotype d'IC ont été caractérisées. Ainsi, l'espèce *Po. dilatatus*, qui héberge une bactérie entraînant un phénotype d'IC, pourra faire l'objet d'études similaires. Les résultats obtenus pourront être comparés à ceux d'*A. vulgare* afin d'observer les effets communs ou spécifiques que peuvent induire ces souches sur l'immunité de leur hôte.

Chez *A. vulgare*, un autre genre de bactéries endosymbiotiques a été identifiée : le genre *Spiroplasma* (Lepelletier 2009). Chez les insectes, des bactéries de ce genre peuvent induire des modifications de la reproduction (Duron *et al.* 2008) mais aussi avoir un impact sur l'immunité de leur hôte. Ainsi, chez *D. neotestacea*, *Spiroplasma* confère une protection contre un nématode (Jaenike *et al.* 2010), conduisant par ailleurs cette bactérie à se répandre rapidement dans les populations. Chez *D. hydei*, cette même bactérie confère une résistance au parasitoïde *Leptopilina heterotoma* (Xie *et al.* 2010). Les études de cet autre endosymbiote co-adapté à l'hôte est une opportunité pour comprendre les stratégies sélectionnées chez *Spiroplasma* et *Wolbachia* ou pour mettre en évidence les similitudes et les différences pouvant expliquer leur succès écologique. L'étude du niveau moléculaire au niveau populationnelle de ces endosymbioses permettrait de mieux comprendre le succès de *Wolbachia* au sein des différentes populations.

L'interaction hôte/*Wolbachia* pourra aussi être abordée du côté du symbiote. En effet, les perturbations observées au niveau transcriptomique ou au niveau des paramètres immunitaires pourraient résulter d'une action directe de la bactérie *via* des facteurs de virulence. Parmi les gènes candidats pouvant coder ces facteurs, les

gènes codant des protéines présentant des domaines d'interaction protéine/protéine de type eucaryote, tels que les domaines ankyrines, semblent être des candidats à privilégier (Fenn et Blaxter 2006). En effet, de nombreux gènes codant ce type de protéines ont été identifiés au sein des génomes de *Wolbachia* déjà séquencés ainsi que dans celui de la souche *wVulC* en cours d'assemblage (Pichon *et al.* soumis). Ces protéines, potentiellement exportées dans la cellule hôte *via* un système de sécrétion, pourraient être impliquées dans des interactions avec des protéines d'*A. vulgare* et par conséquent perturber certaines voies favorisant le maintien de la bactérie dans la cellule. L'identification des cibles de ces protéines nous permettrait de mieux comprendre entre autre l'interaction entre la bactérie et le système immunitaire. Il s'agit ici du travail de thèse de Sandrine Geniez (direction P. Grève et B. Slatko).

De plus, l'analyse du transcriptome du symbiote pourrait être une autre piste pour identifier ces facteurs de virulence. La comparaison des transcriptomes des souches *wVulC* native et virulente permettrait de mettre en évidence les gènes sur- et sous-exprimés chez cette souche au phénotype extrême et ainsi révéler les facteurs de virulence qui la caractérisent.

Cinquième partie

Matériels et Méthodes

1 Matériel biologique

Les travaux réalisés portent sur l'espèce d'isopode terrestre *A. vulgare* (Latreille). Ce crustacé Malacostracé de la famille des Armadillidiidae (Brandt) est très commun dans les zones agricoles en France. Deux types de lignées sont entretenus depuis de nombreuses années au laboratoire :

- les lignées amphogènes (sex-ratio équilibré),
- les lignées thélygènes (sex-ratio biaisé vers les femelles), infectées par la souche *wVul* de *Wolbachia* et dans laquelle apparaissent des individus intersexués.

Pour chacune de ces lignées, plusieurs populations sont disponibles au laboratoire. Au sein de ces populations, différentes souches de *wVul* ont été identifiées et utilisés au cours de cette étude : *wVulC* provenant de Celles-sur-Belle (79) et *wVulM* provenant de Mery-sur-Cher (18) (Cordaux *et al.* 2004). Les populations d'*A. vulgare* utilisées pour cette étude sont :

- la population BF, amphogène, provenant de l'arrière pays niçois (06) (date de récolte : 1967),
- la population ZN, thélygène, provenant de Niort (79), infectée par la souche *wVulC* (date de récolte : 1961),
- la population WX, amphogène, échantillonnée à Helsingör (Danemark) (date de récolte : 1991),
- la population WXw, thélygène, constituée à partir d'individus provenant de la population WX auxquels des *Wolbachia* de la souche *wVulC* isolées des individus récoltés au Danemark ont été injectées,
- la population BI, thélygène, provenant de Mery-sur-Cher (18), infectée par la souche *wVulM* (date de récolte : 1999).

Ces populations sont maintenues à 20°C en photopériode naturelle dans des bacs de plastique (10 × 30 cm) contenant du terreau humide et de la nourriture *ad libitum* constituée de carottes et de feuilles de tilleul sèches.

Avant chaque expérimentation, la cuticules des animaux est désinfectées par deux immersions successives des individus dans une solution d'eau de Javel à 3% suivies d'une troisième immersion dans de l'eau distillée. Chaque bain dure environ 30 secondes. Les animaux sont ensuite déposés sur un papier absorbant afin d'absorber l'excédant d'eau.

2 Prélèvement du matériel biologique

2.1 Prélèvement de l'hémolymphe

A l'aide d'une fine aiguille, un trou est percé dans la membrane articulaire entre le dernier segment du péréion et le premier segment du pléon, au niveau du vaisseau dorsal médian (Figure V-1). L'hémolymphe s'écoulant par ce trou est prélevée rapidement à l'aide d'une pipette et est diluée de moitié dans une solution anticoagulante (MAS : EDTA 9 mM ; glucose 115 mM ; NaCl 336 mM ; citrate de sodium 27 mM ; pH 7 ; Rodriguez *et al.* 1995) maintenue sur de la glace. Le mélange hémolympatique est centrifugé ($200 \times g$, 15 minutes, 4°C). Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont soit remises en suspension dans la solution adéquate pour l'analyse, soit refroidit dans l'azote liquide en attente d'une extraction d'ARN.

Pour énumérer les hémocytes, 9 μ L d'hémolymphe ponctionnés sont déposés dans 57 μ L de MAS, auxquels sont ajoutés 30 μ L de Bleu Trypan 0,4 % (Invitrogen) afin de vérifier la viabilité des cellules. Dix microlitres de ce mélange sont alors analysés au compteur automatique de cellules CountessTM (Invitrogen).

2.2 Prélèvement des ovaires et des organes hématopoïétiques

La première étape consiste à libérer la cavité corporelle de l'animal. Pour cela, l'ablation du telson entraînant le tube digestif ainsi que celle de la tête entraînant les cæca hépatiques est nécessaire. L'animal est ouvert en deux et la paire d'ovaires est prélevée puis déposée soit dans un microtube contenant un tampon pour l'extraction

d'ADN, soit dans un microtube vide refroidi à l'azote liquide dans l'attente d'une extraction d'ARN.

Les animaux, dont les organes hématopoïétiques doivent à être prélevés, sont mis à jeûner deux semaines avant la date de dissection pour réduire la quantité de tissu adipeux entourant les organes afin de faciliter leur prélèvement. Chez *A. vulgare*, les organes hématopoïétiques sont au nombre de trois paires se situant de part et d'autre du vaisseau dorsal au niveau des 6^e et 7^e segment du péréion et du 1^{er} segment du pléon (Figure V-1). Après ablation du telson et de la tête, les sternites sont dégagés afin d'accéder à la cavité générale et aux organes hématopoïétiques. Les organes sont prélevés et sont soit déposés sur lame puis traités pour un marquage TUNEL (cf. § 9.1), soit déposés dans un microtube refroidi dans l'azote liquide contenant déjà un culot d'hémocytes pour l'extraction d'ARN (l'ensemble des ARN extraits seront dit ARN des tissus immunitaires).

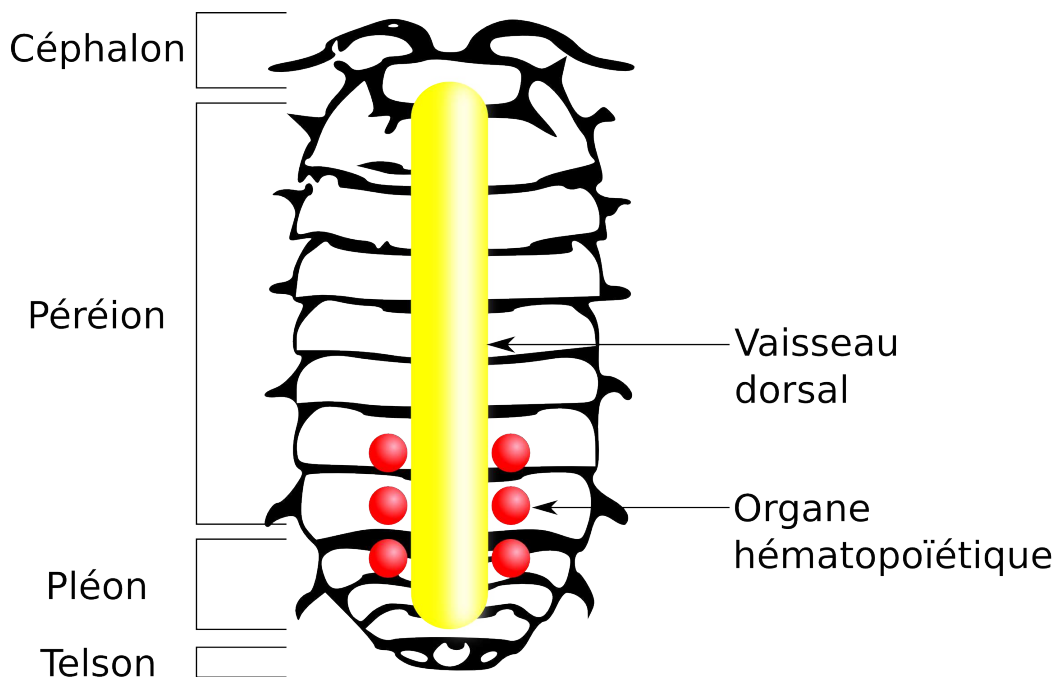


FIGURE V-1 – Schéma de la disposition des organes hématopoïétiques par rapport au vaisseau dorsal chez *A. vulgare*.

3 Vérification du statut symbiotique

3.1 Extraction d'ADN

Le protocole d'extraction d'ADN total est adapté de [Kocher *et al.* \(1989\)](#). Les tissus sont broyés à l'aide d'un pilon dans 400 μL de tampon Wilson (Tris 100 mM; EDTA 100 mM; NaCL 100 mM; SDS 0,1 % (m/v); DTT 50 mM; pH 8) et 5 μL de protéinase K. Le broyat est incubé pendant 4h au bain-marie à 37°C. Ensuite 200 μL de phénol et 200 μL de chloroforme/alcool isoamyle (24/1) sont ajoutés. Les échantillons sont mélangés par retournement puis centrifugés ($11\,000 \times g$, 8 minutes, 15°C). La phase aqueuse est prélevée et déposée dans un nouveau tube. La même opération est répétée sur la phase aqueuse. Ensuite, 400 μL de chloroforme/alcool isoamyle (24/1) sont ajoutés. Les échantillons sont à nouveau mélangés par retournement puis centrifugés ($11\,000 \times g$, 8 minutes, 15°C). La phase aqueuse est récupérée puis de l'acétate de sodium (3M pH 7; 1/10 v/v) et 400 μL d'isopropanol froid sont ajoutés. Les échantillons sont incubés à -20°C sur la nuit. Ils sont ensuite centrifugés ($13\,000 \times g$, 30 minutes, 4°C). L'ADN culotté est lavé deux fois avec 500 μL d'éthanol 70 % froid. Les culots sont enfin séchés puis dilués dans 50 μL d'eau stérile.

3.2 PCR de détection de *Wolbachia*

La présence de *Wolbachia* est vérifiée par amplification PCR du gène *wsp* présent sur le chromosome bactérien. Cette amplification est réalisée à l'aide du couple d'amorces 81-F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') / 691-R (5'-AAAAA-TTAAACGCTACTCCA-3') qui génère un fragment de 650 pb ([Braig *et al.* 1998](#)). Le milieu réactionnel est réalisé à partir du kit GoTaq (Promega) et est constitué de 5 μL de tampon 5X, de 1,25 μL de dNTP (8,6 mM), de 0,25 μL de chaque amorce (10 μM), de 0,125 μL de Taq polymérase (5 unités. μL^{-1}), de 17,625 μL d'eau stérile et de 0,5 μL d'ADN. L'amplification est effectuée selon les cycles suivants : 10 minutes à 95°C, [30 secondes à 95°C, 30 secondes à 55°C, 1 minute à 72°C] $\times$ 35, 10

minutes à 72°C. La présence et la taille de l'amplicon sont vérifiées par migration du produit PCR sur gel d'agarose 1,2 % (m/v) (25 minutes à 100 V).

4 Quantification de l'activité phénoloxydase

La quantification de l'activité PO est réalisée dans une plaque 96 puits à partir d'hémolymphes provenant de trois individus de même statut (symbiotique ou asymbiotique). Un premier échantillon d'hémolymphes ($9\ \mu\text{L} = 3\ \mu\text{L} \times 3$ individus) est déposé dans un premier puits contenant $40\ \mu\text{L}$ de tampon cacodylate (cacodylate de sodium 10 mM (Sigma); chlorure de calcium 10 mM) puis un second échantillon d'hémolymphes provenant des mêmes individus ($9\ \mu\text{L} = 3\ \mu\text{L} \times 3$ individus) est déposé dans un deuxième puits contenant $40\ \mu\text{L}$ de tampon cacodylate supplémentés de phénylthiourée ($1\ \text{mg.mL}^{-1}$ de phénylthiourée dans du tampon cacodylate; Acros Organics), inhibiteur spécifique de l'activité PO. Le tampon cacodylate permet de lyser les cellules afin d'en libérer le contenu. Ensuite, $40\ \mu\text{L}$ de trypsine ($1\ \text{mg.mL}^{-1}$ dans de l'eau bidistillée; Fisher Scientific) sont ajoutés dans chaque puits pour induire le clivage de la proPO, activant ainsi la PO. De cette façon, l'activité PO totale, c'est-à-dire celle circulant dans l'hémolymphes ainsi que l'activité PO latente contenue potentiellement dans les granules hémocytaires, est mesurée. La plaque est ensuite incubée 45 minutes à 37°C. Suite à cette première incubation, $120\ \mu\text{L}$ de L-DOPA ($4\ \text{mg.mL}^{-1}$ préparés extemporanément dans du tampon cacodylate; Acros Organics) sont ajoutés dans chaque puits. L'enzyme responsable de l'activité PO oxyde alors le substrat et transforme ainsi la L-DOPA en dopachrome puis en mélanine de couleur brune. La plaque est immédiatement placée dans un spectrophotomètre pendant 4h à 37°C, la densité optique (DO) étant mesurée à 492 nm toutes les 15 minutes afin de suivre la quantité de substrat oxydé.

5 Gradient continu de Percoll

Afin de séparer les populations d'hémocytes, un gradient continu de Percoll[®] est réalisé. Dans un volume final de 9 mL, 55 % de Percoll[®] (v/v) (GE Healthcare) sont dilués dans une solution de Ringer « isopode » (CaCl₂ 1,4 mM ; NaHCO₃ 2,4 mM ; KCl 2 mM ; NaCl 0,4 M) dont l'osmolarité est ajustée à 750 mOsm avec 183,2 μL^{-1} d'une solution de NaCl 5 M (0,185 M final dans la solution de Percoll[®]) (osmolarité similaire à celle de l'hémolymphe d'*A. vulgare*). Cette solution est préparée dans un tube pour ultracentrifugeuse, préalablement nettoyé avec de l'urée 6 M pH 2 et rincés minutieusement avec de l'eau distillée (Söderhäll *et al.* 2003), afin de réduire l'adhésion des cellules sur les parois. L'établissement du gradient continu de Percoll[®] se fait par centrifugation ($28\,000 \times g$, 30 minutes, 4°C).

L'hémolymphe de 30 animaux est collectée et les 600 μL de cette solution hémolympatique sont déposés sur le gradient de Percoll[®] puis centrifugés ($400 \times g$, 20 minutes, 15°C). Les bandes de cellules sont ensuite récupérées individuellement à travers le gradient à l'aide d'une micropipette puis un volume de solution de Ringer « isopode » est ajouté afin de rompre le gradient. Les hémocytes contenus dans chaque bande cellulaire sont centrifugés ($200 \times g$, 15 minutes, 4°C) puis remis en suspension dans la solution appropriée pour les analyses en MET ou en cytométrie en flux.

6 Cytocentrifugation et coloration des hémocytes

La centrifugation de cellules sur lame, ou cytocentrifugation, est réalisée en prélevant 10 μL d'hémolymphe que l'on dépose dans 240 μL de MAS. La suspension cellulaire est cytocentrifugée pendant 1 minute. Les lames sont ensuite colorées à l'aide du kit de coloration Hemacolor[®]. Les temps de coloration ont été adaptés (1 minute 30 secondes dans la solution 1 ; 1 minute dans la solution 2 ; 1 minute dans la solution 3 ; 2×15 secondes dans le PBS). Enfin les lames sont recouvertes

d'une lamelle (montage eau) puis observées au microscope photonique.

7 Microscopie électronique à transmission

7.1 Hémocytes

Les hémocytes issus du gradient de Percoll[®] sont analysés en microscopie électronique. Pour cette étude de cytologie fine, la technique de double fixation adaptée aux isopodes terrestres (Martin et Dubois 1981) est mise en œuvre avec quelques modifications. Le culot d'hémocytes est plongé dans un fixateur refroidi sur de la glace (glutaraldéhyde 9 %; cacodylate de sodium 0,3 M, pH 7,3-7,4; NaCl 3 %; v/v/v) pendant 45 minutes à 4°C. Après centrifugation ($800 \times g$, 4°C, 15 minutes), les cellules sont placées dans une solution de lavage (cacodylate de sodium 0,3 M; NaCl 3 %; sucrose 0,8 M; v/v/v; osmolarité à 750 mOsm) pendant 15 minutes à 4°C. Après centrifugation ($600 \times g$, 10 minutes, 4°C), le culot d'hémocytes est inclus dans une solution de gélose à 2 % à la limite de la solidification ($\sim 37^\circ\text{C}$). Après la prise en masse de la gélose, des petits cubes d'un mm^3 sont découpés, sous loupe binoculaire, à l'endroit où la concentration en cellules paraît importante. Ces cubes sont plongés dans la solution de lavage iso-osmotique pendant 2h à 4°C. Après élimination du liquide de lavage, les blocs de gélose sont incubés dans le post-fixateur contenant du tétroxyde d'osmium (cacodylate de sodium 0,3 M; NaCl 5,5 %; OsO_4 4 %; v/v/v) pendant 45 minutes à température ambiante.

La déshydratation des blocs est réalisée dans des solutions d'acétone de concentrations croissantes (de 35 % à 100 %). L'imprégnation de résine est effectuée en 2 étapes :

- acétone 100 %-résine (Spurr, Polyscience Inc.) (v/v) pendant 12h à température ambiante.
- résine pure dans les mêmes conditions.

L'inclusion est effectuée dans des « moules à plat » qui permettent une orientation

des pièces ; la polymérisation de la résine s'effectue pendant 24h dans une étuve à 70°C.

Des coupes semi-fines et ultra-fines sont ensuite réalisées par Maryline Raimond à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert OMU3) muni d'un couteau soit de verre soit de diamant. Les coupes semifines d'un micromètre d'épaisseur sont colorées au bleu de Toluidine à 1 % (pH 8,8) et observées au microscope photonique afin d'estimer la qualité de l'échantillon. Les coupes ultrafines, récoltées sur des grilles en cuivre (300 mesh) sont contrastées selon la méthode de [Reynolds \(1963\)](#) en 2 temps :

- acétate d'uranyle 1 % dans de l'alcool 50 %, 1 minute
- citrate de plomb, 10 minutes (à l'obscurité)

Les observations sont réalisées sur le microscope électronique à transmission JEOL 100C.

7.2 Organes hématopoïétiques

Les organes hématopoïétiques des animaux asymbiotiques subissent une double fixation classique. En revanche, suite à des observations empiriques, ceux des animaux infectés par *Wolbachia* subissent une post-fixation réduite en temps (5 minutes) avec une concentration en OsO_4 amenée à 1 % final afin de préserver leur intégrité. Des coupes semi-fines et ultra-fines sont réalisées de la même façon par Maryline Raimond. Les observations sont faites sur le même microscope électronique que précédemment.

8 Cytométrie en flux

Pour chaque analyse en cytométrie en flux, le nombre d'hémocytes en suspension dans le tampon anticoagulant (MAS) est ajusté à 10^5 hémocytes pour 500 μL . Les analyses de cytométrie en flux sont réalisées à l'aide d'un FACS Canto II (BD Biosciences) équipée d'un laser Argon (488 nm). Deux paramètres cytométriques sont

pris en compte : la diffraction frontale (*forward scatter height* – FSC) et la diffraction latérale (*side scatter height* – SSC). Les cellules mortes sont marquées à l’iodure de propidium (IP) (concentration finale de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Pour chaque échantillon d’hémocytes, 50 000 évènements sont comptés. L’analyse est visualisée sous forme de dot plot indiquant la taille des cellules (valeurs du FSC) et leur complexité interne (valeurs du SSC). Le logiciel Diva 6.0 (BD Biosciences) est utilisé pour créer des fenêtrages afin d’analyser le nombre d’évènements au sein de chacune des fenêtres.

Concernant l’analyse statistique des résultats de cytométrie en flux, la normalité de la distribution et l’homoscédasticité des valeurs FSC et SSC sont vérifiées respectivement par un test de Shapiro-Wilk et un test de Bartlett. Les données dont la distribution est normale sont analysées à l’aide d’un test *t*. Sinon un test de Wilcoxon est utilisé. Le nombre d’évènements est comparé à l’aide d’un test de Pearson. Ces tests ont été réalisés avec le logiciel JMP (v2.5, SAS Institute Inc.).

9 Quantification des phénomènes apoptotiques

9.1 Microscopie confocale

Le marquage de phénomènes apoptotiques effectué sur lame est réalisé à l’aide du kit *TUNEL In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche) sur organes hématopoïétiques (protocole *Labeling Protocol for Adherent Cells, Cell Smears, Cytospin Preparations, and Tissues*) et hémocytes (protocole *Cell Suspension*). Les noyaux des échantillons sont marqués au ToPro III (dilué au 1/500 000 dans du PBS, Invitrogen) (incubation 30 minutes 4°C). Les échantillons sont montés entre lame et lamelles dans un milieu Mowiol. Les lames sont ensuite stockées au minimum 24h à 4°C avant observation au microscope confocale. Afin de vérifier l’efficacité du marquage, des témoins positifs sont générés à l’aide d’une DNase I selon les recommandations du manufacturier.

9.2 Cytométrie en flux

Le marquage est réalisé à l'aide du kit *Annexin-V-FLUOS Staining* (Roche) dont le protocole a été adapté. L'hémolymphe de 3 individus ($3 \times 10 \mu\text{L}$) est prélevée et diluée (1/3) dans $120 \mu\text{L}$ de tampon MAS modifié (mMAS : glucose 142 mM ; NaCl 336 mM ; citrate de sodium 27 mM, pH 7). L'EDTA a été retiré car ce chélateur d'ions bivalents perturbe le marquage Annexine (dépendant du Ca^{2+}) et la concentration de glucose a été augmentée afin de maintenir l'osmolarité initiale. Le mélange hémolympatique est centrifugé ($200 \times g$, 5 minutes, 4°C). Le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées dans $150 \mu\text{L}$ d'un tampon PBS+Glucose (PBS+Glc) (NaCl 137 mM ; KCl 2,68 mM ; Na_2HPO_4 10,13 mM ; KH_2PO_4 1,76 mM ; glucose 436 mM) pendant 5 minutes à température ambiante. Les trois échantillons correspondant aux témoins positifs sont quant à eux mis en suspension dans du PBS+Glc+Triton X-100 (0,001 % ; v/v). Le Triton X-100 génère des pores au niveau des membranes cellulaires, mimant ainsi des phénomènes apoptotiques. Une nouvelle centrifugation ($200 \times g$, 5 minutes, 4°C) est réalisée. Le surnageant est ensuite éliminé et les échantillons incubés avec $100 \mu\text{L}$ de solution de marquage [1/1/108, Annexine V/IP/tampon HEPES+Glucose, v/v/v (Tampon HEPES : HEPES 10 mM ; NaCl 140 mM ; CaCl_2 2,5 mM ; pH 7,4)], pendant 15 minutes à $22,5^\circ\text{C}$ dans une chambre noire. Chacun des trois témoins positifs est incubé avec $100 \mu\text{L}$ soit d'une solution de marquage, soit d'une solution d'Annexine V (1/109, Annexine V/tampon, HEPES+Glc, v/v) ou d'une solution d'IP (1/109, IP/tampon HEPES+Glc, v/v).

L'Annexine V permet de marquer les phosphatidylserines exposés extracellulairement uniquement lors des phénomènes apoptotiques tandis que l'IP permet, quant à lui, de marquer l'ADN des cellules nécrosées (ayant été détériorées durant leur manipulation) ainsi que des cellules en apoptose tardive. Les témoins permettent de calibrer le fenêtrage du dot plot lors de l'analyse. A la suite de l'incubation, $400 \mu\text{L}$ de tampon HEPES sont ajoutés (1/4, suspension de cellules/tampon). Dix microlitres de suspension cellulaire sont prélevés pour la numération hémoctaire de

chaque échantillon afin de vérifier que la quantité de cellules est de l'ordre de 10^5 cellules.

L'ensemble des échantillons est analysé en cytométrie en flux. Pour chaque échantillon, 20 000 évènements sont comptés. L'analyse est visualisée sous forme de dot plot en fonction des deux paramètres de fluorescence (FITC et PE). Le logiciel Diva 6.0 (BD Biosciences) est utilisé pour créer des fenêtrages afin d'analyser le nombre d'évènements de chacune des fenêtres.

10 Injections de billes

10.1 Phagocytose

Les billes Fluoresbrite™ plain YG (Polysciences Inc.) utilisées pour mettre en évidence les évènements de phagocytose sont diluées au 1/5^e dans du Ringer « isopode ». Un microlitre de la dilution est injecté dans la cavité générale de l'animal, au niveau du 6^e segment du péréion, à l'aide d'une seringue Hamilton munie d'un capillaire effilé. Les animaux sont ensuite mis à 20°C et à l'obscurité jusqu'au prélèvement d'hémolymphe. Dix microlitres d'hémolymphe sont ainsi prélevés 0h30, 1h, 2h ou 4h après injection et déposés dans 490 μL de MAS. Les hémocytes sont ensuite analysées par cytométrie en flux.

10.2 Encapsulement

Une solution de billes de Sephadex® à environ 100 billes. μL^{-1} est préparée à partir de billes déshydratées dissoutes dans du Ringer « isopode ». Dix microlitres de la solution de billes sont injectés dans la cavité générale de l'animal, au niveau du 6^e segment du péréion, à l'aide d'une seringue à insuline. Les animaux sont disséqués après 8 jours d'incubation et les billes se trouvant dans la cavité générale sont récupérées pour observation en microscopie photonique entre lame et lamelle (montage eau).

Tableau V-1 – Conditions de culture et origine des micro-organismes utilisés pour les infections expérimentales.

Type	Souche	Milieu de culture à 37°C		Provenance
		Solide	Liquide	
Gram(+)	<i>Bacillus megaterium</i>	LB/agar(1 %)	LB	Aimablement fournies par le Pr. J. Frère (UMR CNRS 6008)
	<i>Staphilococcus lugdunensis</i>	LB/agar(1 %)	LB	
	<i>Listeria ivanovii</i>	LB/agar(1 %)	LB	
Gram(–)	<i>Salmonella typhimurium</i>	LB/agar(1 %)	LB	Aimablement fournies par le Pr. Aziz Heddi
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	LB/agar(1 %)	LB	Aimablement fournies par le Pr. J. Frère (UMR CNRS 6008)
	<i>Escherichia coli</i>	LB/agar(1 %)	LB	

11 Infections expérimentales

11.1 Infections bactériennes

Des infections expérimentales sont réalisées à l'aide de différentes souches bactériennes (Tableau V-1). Pour chaque infection, les bactéries sont tout d'abord étalées sur milieu solide à partir d'une solution stock conservée à -80°C puis incubées à 37°C sur la nuit. A partir de cet étalement, une colonie est prélevée et déposée dans un milieu de culture liquide qui est ensuite incubé à 37°C sur la nuit. La DO de la culture est mesurée et la quantité de bactérie est estimée sur la base de la correspondance $\text{DO}=1 \leftrightarrow 10^6 \text{ bactéries}.\mu\text{L}^{-1}$. Les cultures sont ensuite diluées pour obtenir une concentration de $10^5 \text{ bactéries}.\mu\text{L}^{-1}$, hormis la culture de *V. alginolyticus* qui est diluée pour obtenir une concentration de $10^3 \text{ bactéries}.\mu\text{L}^{-1}$. Un microlitre de solution bactérienne (ou d'un cocktail équivolumétrique de solutions bactériennes) est injecté dans la cavité générale de l'animal, au niveau du 6^e segment du péréion, à l'aide d'une seringue Hamilton munie d'un capillaire effilé. A chaque infection, dix animaux sont injectés. Afin de vérifier la concentration de la culture bactérienne injectée, des dilutions au 1/100^e et au 1/1000^e sont effectuées et étalées sur milieu solide. Après incubation à 37°C sur la nuit, les colonies sont comptées et la concentration réelle calculée.

Dans le cadre de l'évaluation de l'immunocompétence des individus, la survie des animaux est suivie à temps régulier sur une semaine avec un pas de 1h les premières 32h, un pas de 2h les 48h suivantes et un pas de 24h jusqu'à 168h.

Dans le cadre de la création des banques du projet ANR ImmunSymbArt, les animaux injectés sont soit ponctionnés afin de déterminer le THC soit broyés dans l'azote pour en extraire l'ARN (cf. § 13.1).

11.2 Infections fongiques

Le champignon *M. anisopliae* (DMSZ, Allemagne) est cultivé à 27°C en alternance jour/nuit (16h/8h) sur milieu S31 solide. Les spores sont récupérées 3 semaines plus tard par immersion des mycelia dans une solution de Triton X-100 0,05 %. La solution est ensuite ajustée à 2.10^6 spores.mL⁻¹. Une solution identique dépourvue de spores est utilisée comme contrôle négatif. Afin de contrôler l'efficacité de l'infection, le coléoptère *T. molitor*, sensible à cet agent pathogène, est utilisée comme témoin.

Les animaux sont individuellement immergés pendant 5 secondes dans la solution contenant les spores (animaux infectés) ou dans la solution dépourvue de spores (animaux témoins). Le surplus de solution des animaux immergés est absorbé sur papier absorbant. Les animaux sont ensuite placés individuellement sur leur litière d'élevage avec une même quantité de nourriture. Trois infections indépendantes sont menées, utilisant 7 femelles symbiotiques, 7 femelles asymbiotiques, 7 mâles et 10 *T. molitor*. Le taux de survie des animaux suite à l'infection est suivi sur une période de 20 semaines.

11.3 Analyse statistique

Les données de survie sont analysées par un test de Log-Rank réalisés avec le logiciel R (v2.10.1).

12 Quantification de l'expression de gènes

12.1 Extractions des ARN totaux

Les ARN d'animaux entiers sont extraits par broyages des animaux au pilon dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre dont quelques milligrammes (entre 20 et 30 mg) sont déposés dans 1 mL de TRIzol (Invitrogen). Le mélange est

ensuite soumis aux ultrasons (3 pulses de 15 secondes entrecoupés de 10 secondes de repos sur glace, intensité à 40 %) (Vibracell, Sonics) puis centrifugé ($8\,000 \times g$, 3 minutes, 4°C). Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau microtube. Un volume de 0,2 mL de chloroforme est ajouté et les tubes sont agités vigoureusement pendant 15 secondes et incubés 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation ($12\,000 \times g$, 15 minutes, 4°C), la phase aqueuse est déposée dans 0,5 mL d'isopropanol afin de précipiter les ARN. Les tubes sont agités doucement pendant 15 secondes puis incubés pendant 10 minutes à température ambiante avant une nouvelle centrifugation ($12\,000 \times g$, 10 minutes, 4°C). Le culot d'ARN est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % froid. Les tubes sont agités par retournement pendant 15 secondes et centrifugés ($7\,500 \times g$, 5 minutes, 4°C). Le maximum d'éthanol est ensuite retiré puis les culots sont séchés. Les ARN sont dissouts dans 40 μL d'eau filtrée 0,2 μm . La concentration de la solution d'ARN est mesurée à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific) à 260 nm et sa pureté est estimée grâce au rapport de longueurs d'onde 260/280 nm. La solution d'ARN est ensuite conservée à -80°C .

Les ARN de tissus sont extraits à l'aide du kit *RNEasy Mini kit* (QIAGEN). Les ARN d'ovaires sont extraits suivant le protocole *Purification of Total RNA from Animal Tissues* et ceux des tissus immunitaires (hémocytes et organes hématopoïétiques) suivant le protocole *Purification of Total RNA from Cells*. Les ARN sont respectivement élués dans 50 μL d'eau filtrée 0,2 μm pour les ovaires et 30 μL pour les tissus immunitaires. La concentration de la solution d'ARN est mesurée à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific) à 260 nm et sa pureté est estimée grâce au rapport de longueurs d'onde 260/280 nm. La solution d'ARN est ensuite conservée à -80°C .

L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (m/v) dans du tampon MOPS 1X (3[N-morpholino]propane sulfonacide, pH 7,0 / MOPS 5X : MOPS 0,1 M ; acétate de sodium 40 mM ; EDTA 1 mM) auquel sont ajoutés du formaldéhyde (17 %) et 0,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de bromure d'éthidium (BET). Avant dépôt

sur gel, les échantillons sont séchés sous vide, puis repris dans 10 μ L de tampon de charge (formamide 48 %; formaldéhyde 6,4 %; bleu de bromophénol 0,25 %; glycérol 6,6 % dans du tampon MOPS 1X). Après migration, les bandes d'ARN sont visualisées par illumination aux UV (Sambrook *et al.* 1989).

12.2 Rétrotranscription

Les rétrotranscriptions (RT) d'ARN totaux sont réalisées avec le kit *SuperScriptIII First-Strand Synthesis* (Invitrogen), à partir de 1 μ g d'ARN total à l'aide d'amorces aléatoires (hexamères). Les ADNc synthétisés sont ensuite dilués au $1/10^e$ et $1/100^e$ puis des fractions aliquotes sont conservées à -80°C . Des témoins négatifs (RT-), dans lesquels la rétrotranscriptase est omise, sont réalisés dans les mêmes conditions afin de quantifier la contamination en ADNg.

12.3 PCR quantitative

Pour chaque gène, une paire d'amorces est dessinée à l'aide de la fonction *Real-time PCR* de Perlprimer (Marshall 2004). La T_m et la longueur de chaque amorce sont fixées respectivement à 60°C et à 18 à 22 pb.

Les quantifications par RT-qPCR sont réalisées à l'aide du LightCycler LC480 (Roche) selon les cycles suivants : 10 minutes à 95°C , [10 secondes à 95°C , 10 secondes à 60°C , 20 secondes à 72°C] $\times$ 45. Une courbe de fusion [5 secondes à 95°C , 1 minutes de 65°C à 97°C (2°C.s^{-1})] est réalisée à la fin de l'ensemble des cycles pour vérifier qu'un seul produit PCR a été généré. Le milieu réactionnel est constitué de 0,5 μ L de chaque amorce (10 μ M), de 5 μ L de *Fast SYBR-Green Master Mix* (Roche), de 1,5 μ L d'eau stérile et de 2,5 μ L d'ADNc (correspondant à 12,5 ng d'ADNc). Pour chaque expression de gène quantifiée, une courbe standard est réalisée afin de calculer l'efficacité PCR. Ces courbes standards sont composées de 4 points issus de dilutions sérielles au $1/10^e$, $1/50^e$, $1/250^e$, $1/1000^e$, correspondant à 125 ng, 25 ng, 5 ng et 1,25 ng d'un mélange d'ADNc des différents échantillons utilisés.

Les données d'expression de chaque gène sont calculées à l'aide de l'efficacité de la PCR de chaque paire d'amorces et du crossing point (c'est-à-dire du point de croisement entre la ligne de base et la tangente au point d'inflexion de la sigmoïde issu de la mesure de la fluorescence lors de l'amplification de l'ADNc cible) (Pfaffl 2001). Les données d'expression de gène sont normalisées par une moyenne géométrique des niveaux d'expression des gènes de référence codant la protéine ribosomique L8 (RbL8) et le facteur d'élongation 2 (EF2). La normalisation et les comparaisons statistiques par paire sont réalisées à l'aide du logiciel REST (Pfaffl *et al.* 2002).

13 Banques d'ADNc du projet ANR ImmunSymbArt

L'ANR ImmunSymbArt, dont l'objectif est de comprendre les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le maintien et le contrôle de la symbiose, se base en partie sur une approche transcriptomique. Cette approche repose sur la méthode du RNA-Seq qui utilise les nouvelles techniques de séquençage. Dans ce cadre, 16 nouvelles banques sont réalisées à partir d'ARN d'animaux entiers infectés ainsi que d'ARN de tissus d'ovaires ou de système immunitaire (tableau III-5).

13.1 Extractions d'ARN totaux

Les banques d'animaux entiers infectés sont réalisées à partir de trois types d'infections indépendantes : des infections par un cocktail de bactéries Gram(+) [*M. luteus* (10^5 bactéries. μL^{-1}) et *S. lugdunensis* (10^5 bactéries. μL^{-1})], des infections par un cocktail de bactéries Gram(−) [*E. coli* (10^5 bactéries. μL^{-1}) et *V. alginolyticus* (10^3 bactéries. μL^{-1})] et des infections par *L. ivanovii* (10^5 bactéries. μL^{-1}). Ces infections sont réalisées selon la méthode décrite au paragraphe 11.1. À 1h, 3h et 9h post-injection, 3 animaux sont broyés pour chaque infection et leurs ARN extraits selon la méthode décrite au paragraphe 12.1. Pour chaque temps, les ARN issus

de chaque infection sont mélangés proportionnellement au nombre d'espèces bactériennes utilisées pour l'injection. Les trois mélanges qui en résultent, correspondant aux trois temps de prélèvement, sont à leur tour mélangés pour constituer le pool d'ARN permettant la réalisation de la banque d'ADNc.

Les ARN totaux d'ovaires et de tissus immunitaires d'animaux asymbiotiques, symbiotiques *wVulC* et symbiotiques *wVulM* sont extraits selon la méthode décrite au paragraphe 12.1.

13.2 Rétrotranscription et amplification des ADNc

La RT des ARNm ainsi que l'amplification des ADNc sont réalisées à l'aide du kit *SMARTer PCR cDNA Synthesis* (Clontech) et selon le protocole du manufacturier. Pour chaque banque d'ovaire ou de tissus immunitaires, une banque réplikat est réalisée. Ces deux banques sont construites à partir de deux RT indépendantes ayant pour matrice un même lot d'ARN totaux. Par conséquent, ces banques réplikats représentent des réplikats techniques des RT, ceci afin de valider la future analyse des banques par assemblage *de novo*.

Les ADNc amplifiés sont ensuite purifiés sur colonne à l'aide du kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN) selon le protocole *PCR Purification Spin Protocol*. Chaque colonne est éluée avec 30 μ L d'eau stérile.

Les ADNc sont dosés à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific) à 260 nm puis envoyés au Génoscope pour séquençage basé sur la technologie Illumina/Solexa.

Bibliographie

-
- ADAMO S. A. : Estimating disease resistance in insects : phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *J Insect Physiol*, 50(2-3):209–216, 2004a.
- ADAMO S. A. : How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour*, 68(6):1443–1449, 2004b.
- ANSELME C., VALLIER A., BALMAND S., FAUVARQUE M.-O. et HEDDI A. : Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl Environ Microbiol*, 72(10):6766–6772, 2006.
- AO J., LING E. et YU X.-Q. : Drosophila C-type lectins enhance cellular encapsulation. *Mol Immunol*, 44(10):2541–2548, 2007.
- ARRIGONI O. et TULLIO M. C. D. : Ascorbic acid : much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1569(1-3):1–9, 2002.
- ASHOK Y. : *Drosophila* toll pathway : the new model. *Sci Signal*, 2(52):jc1, 2009.
- AVERY S. V. : Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*, 434(2):201–210, 2011.
- BABIN A., BIARD C. et MORET Y. : Dietary supplementation with carotenoids improves immunity without increasing its cost in a crustacean. *Am Nat*, 176(2):234–241, 2010.
- BARR K. L., HEARNE L. B., BRIESACHER S., CLARK T. L. et DAVIS G. E. : Microbial symbionts in insects influence down-regulation of defense genes in maize. *PLoS One*, 5(6):e11339, 2010.
- BAUCHAU A. G. : Crustaceans. *Invertebrate Blood Cells*, volume 2, chapitre Crustaceans, pages 385–420. Academic Press, London, 1981.

-
- BAYNE C. J. : Phagocytosis and Non-Self Recognition in Invertebrates. *BioScience*, 40(10):723–731, 1990.
- BAZZOCCHI C., COMAZZI S., SANTONI R., BANDI C., GENCHI C. et MORTARINO M. : *Wolbachia* surface protein (WSP) inhibits apoptosis in human neutrophils. *Parasite Immunol*, 29(2):73–79, 2007.
- BELL K. L. et SMITH V. J. : In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Dev Comp Immunol*, 17(3):211–219, 1993.
- BENDICH A. et OLSON J. A. : Biological actions of carotenoids. *FASEB J*, 3(8):1927–1932, 1989.
- BERGMANN A. et STELLER H. : Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*, 3(145):re8, 2010.
- BIAN G., XU Y., LU P., XIE Y. et XI Z. : The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*, 6(4):e1000833, 2010.
- BIDLA G., HAULING T., DUSHAY M. S. et THEOPOLD U. : Activation of insect phenoloxidase after injury : endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun*, 1(4):301–308, 2009.
- BOUCHON D., RIGAUD T. et JUCHAULT P. : Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans : molecular identification and host feminization. *Proc Biol Sci*, 265(1401):1081–1090, 1998.
- BOUCHON D., CORDAUX R. et GRÈVE P. : Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. *Insect Symbiosis*, volume 3, chapitre 12, pages 273–294. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2008. ISBN 978-1-4200-6410-0.

-
- BOURTZIS K., PETTIGREW M. M. et O'NEILL S. L. : *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. *Insect Mol Biol*, 9 (6):635–639, 2000.
- BRAIG H. R., ZHOU W., DOBSON S. L. et O'NEILL S. L. : Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol*, 180(9):2373–2378, 1998.
- BRAQUART-VARNIER C., LACHAT M., HERBINIÈRE J., JOHNSON M., CAUBET Y., BOUCHON D. et SICARD M. : *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *PLoS One*, 3(9):e3286, 2008.
- BRAUN T. et WOOLLARD A. : RUNX factors in development : lessons from invertebrate model systems. *Blood Cells Mol Dis*, 43(1):43–48, 2009.
- BREEUWER J. A., STOUTHAMER R., BARNS S. M., PELLETIER D. A., WEISBURG W. G. et WERREN J. H. : Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera : Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol Biol*, 1(1):25–36, 1992.
- BRENNAN L. J., KEDDIE B. A., BRAIG H. R. et HARRIS H. L. : The endosymbiont *Wolbachia pipientis* induces the expression of host antioxidant proteins in an *Aedes albopictus* cell line. *PLoS One*, 3(5):e2083, 2008.
- BROSTOFF J., MALE D. et ROITT I. : De Boeck Université, 3 édition, 2002. ISBN 978-2804140571.
- BROWNLIE J. C. et JOHNSON K. N. : Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol*, 17(8):348–354, 2009.
- BULGHERESI S., SCHABUSSOVA I., CHEN T., MULLIN N. P., MAIZELS R. M. et OTT J. A. : A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode. *Appl Environ Microbiol*, 72(4):2950–2956, 2006.

-
- BURMESTER T. : Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol B*, 172(2):95–107, 2002.
- CALLEWAERT L. et MICHIELS C. W. : Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci*, 35(1):127–160, 2010.
- CASIRAGHI M., BORDENSTEIN S. R., BALDO L., LO N., BENINATI T., WERNEGREEN J. J., WERREN J. H. et BANDI C. : Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on gltA, groEL and ftsZ gene sequences : clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151(Pt 12):4015–4022, 2005.
- CERENIUS L. et SÖDERHÄLL K. : The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev*, 198:116–126, 2004.
- CERENIUS L., LEE B. L. et SÖDERHÄLL K. : The proPO-system : pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*, 29(6):263–271, 2008.
- CERENIUS L., BABU R., SÖDERHÄLL K. et JIRAVANICHPAISAL P. : In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J Invertebr Pathol*, 103(1):21–23, 2010a.
- CERENIUS L., KAWABATA S.-i., LEE B. L., NONAKA M. et SÖDERHÄLL K. : Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci*, 35(10):575–583, 2010b.
- CHARROUX B., RIVAL T., NARBONNE-REVEAU K. et ROYET J. : Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes Infect*, 11(6-7):631–636, 2009.
- CHAVES S., NETO M. et TENREIRO R. : Insect-symbiont systems : from complex relationships to biotechnological applications. *Biotechnol J*, 4(12):1753–1765, 2009.

-
- CHERRY S. et SILVERMAN N. : Host-pathogen interactions in *Drosophila* : new tricks from an old friend. *Nat Immunol*, 7(9):911–917, 2006.
- CHEVALIER F., HERBINIÈRE-GABOREAU J., BERTAUX J., RAIMOND M., MOREL F., BOUCHON D., GRÈVE P. et BRAQUART-VARNIER C. : The Immune Cellular Effectors of Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare* : Meeting with Their Invaders, *Wolbachia*. *PLoS One*, 6(4):e18531, 2011.
- CHEVALIER F., HERBINIÈRE-GABOREAU J., CHARIF D., MITTA G., GAVORY F., WINKER P., GRÈVE P., BRAQUART-VARNIER C. et BOUCHON D. : Feminizing *Wolbachia* : A transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiol*, (accepté), 2012.
- CHOW J., LEE S. M., SHEN Y., KHOSRAVI A. et MAZMANIAN S. K. : Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*, 107:243–274, 2010.
- CHOWDHURY D. et NOVINA C. D. : RNAi and RNA-based regulation of immune system function. *Adv Immunol*, 88:267–292, 2005.
- COATES C. J., KELLY S. M. et NAIRN J. : Possible role of phosphatidylserine-hemocyanin interaction in the innate immune response of *Limulus polyphemus*. *Dev Comp Immunol*, 35(2):155–163, 2011.
- COMBES C. : Masson, Paris, 1st édition, 1995. ISBN 2-225-848000-9.
- CORDAUX R., MICHEL-SALZAT A., FRELON-RAIMOND M., RIGAUD T. et BOUCHON D. : Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare* : evolutionary implications. *Heredity*, 93(1):78–84, 2004.
- CORNET S., BIARD C. et MORET Y. : Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea : Amphipoda). *Oecologia*, 159(2):257–269, 2009.

-
- COSSART P. et SANSONETTI P. J. : Bacterial invasion : the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668):242–248, 2004.
- COUTANT M.-F. : Thèse de doctorat, 1977.
- CUTHBERTSON B. J., DETERDING L. J., WILLIAMS J. G., TOMER K. B., ETIENNE K., BLACKSHEAR P. J., BÜLLESBACH E. E. et GROSS P. S. : Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev Comp Immunol*, 32(3):167–181, 2008.
- DALE C. et MORAN N. A. : Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126(3):453–465, 2006.
- DECKER H. et JAENICKE E. : Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev Comp Immunol*, 28(7-8):673–687, 2004.
- DECKER H., SCHWEIKARDT T., NILLIUS D., SALZBRUNN U., JAENICKE E. et TUCZEK F. : Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*, 398(1-2):183–191, 2007.
- DEDEINE F., VAVRE F., FLEURY F., LOPPIN B., HOCHBERG M. E. et BOULETREAUX M. : Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11):6247–6252, 2001.
- DEDEINE F., BOULÉTREAUX M. et VAVRE F. : *Wolbachia* requirement for oogenesis : occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity*, 95(5):394–400, 2005.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN D., SAULNIER D., GARNIER J., JOUFFREY C., BULET P. et BACHÈRE E. : Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem*, 276(50):47070–47077, 2001.

-
- DOBSON S. L., RATTANADECHAKUL W. et MARSLAND E. J. : Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, 93(2):135–142, 2004.
- DOUGLAS A. E. : Princeton University Press, 2010. ISBN 978-0-691-11341-8.
- DUNCAN A. B., MITCHELL S. E. et LITTLE T. J. : Parasite-mediated selection and the role of sex and diapause in *Daphnia*. *J Evol Biol*, 19(4):1183–1189, 2006.
- DURON O., BOUCHON D., BOUTIN S., BELLAMY L., ZHOU L., ENGELSTÄDTER J. et HURST G. D. : The diversity of reproductive parasites among arthropods : *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol*, 6:27, 2008.
- DZIARSKI R. et GUPTA D. : The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol*, 7(8):232, 2006.
- FAGUTAO F. F., KOYAMA T., KAIZU A., SAITO-TAKI T., KONDO H., AOKI T. et HIRONO I. : Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS J*, 276(18):5298–5306, 2009.
- FALCO A., ORTEGA-VILLAIZAN M., CHICO V., BROCAL I., PEREZ L., COLL J. M. et ESTEPA A. : Antimicrobial peptides as model molecules for the development of novel antiviral agents in aquaculture. *Mini Rev Med Chem*, 9(10):1159–1164, 2009.
- FELLOUS S. et SALVAUDON L. : How can your parasites become your allies ? *Trends in Parasitology*, 25(2):62–66, 2009.
- FENN K. et BLAXTER M. : *Wolbachia* genomes : revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends Parasitol*, 22(2):60–65, 2006.
- FLEGEL T. W. : Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Dev Comp Immunol*, 31(3):217–231, 2007.

-
- FLEGEL T. W. : Hypothesis for heritable, anti-viral immunity in crustaceans and insects. *Biol Direct*, 4:32, 2009.
- FREY A. D. et KALLIO P. T. : Nitric oxide detoxification—a new era for bacterial globins in biotechnology? *Trends Biotechnol*, 23(2):69–73, 2005.
- FRIEDL P. et WEIGELIN B. : Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol*, 9(9):960–969, 2008.
- FRY A. J., PALMER M. R. et RAND D. M. : Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 93(4):379–389, 2004.
- FYTROU A., SCHOFIELD P. G., KRAAIJEVELD A. R. et HUBBARD S. F. : *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proc Biol Sci*, 273(1588):791–796, 2006.
- GAGNAIRE B., GAY M., HUVET A., DANIEL J.-Y., SAULNIER D. et RENAULT T. : Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge : in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol*, 84(1):92–102, 2007.
- GAI Y., WANG L., ZHAO J., QIU L., SONG L., LI L., MU C., WANG W., WANG M., ZHANG Y., YAO X. et YANG J. : The construction of a cDNA library enriched for immune genes and the analysis of 7535 ESTs from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 27(6):684–694, 2009.
- GARCÍA-CARREÑO F. L., COTA K. et NAVARRETE DEL TORO M. A. : Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* : conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J Agric Food Chem*, 56(15):6454–6459, 2008.
- GARDNER P. R., COSTANTINO G. et SALZMAN A. L. : Constitutive and adaptive detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase. *J Biol Chem*, 273(41):26528–26533, 1998.

-
- GHOSH J., LUN C. M., MAJESKE A. J., SACCHI S., SCHRANKEL C. S. et SMITH L. C. : Invertebrate immune diversity. *Dev Comp Immunol*, 2010.
- GLASER R. L. et MEOLA M. A. : The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One*, 5(8):e11977, 2010.
- GOTTAR M., GOBERT V., MATSKEVICH A. A., REICHHART J.-M., WANG C., BUTT T. M., BELVIN M., HOFFMANN J. A. et FERRANDON D. : Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*, 127(7):1425–1437, 2006.
- GROSS R., VAVRE F., HEDDI A., HURST G. D. D., ZCHORI-FEIN E. et BOURTZIS K. : Immunity and symbiosis. *Mol Microbiol*, 73(5):751–759, 2009.
- HALL M., WANG R., van ANTWERPEN R., SOTTRUP-JENSEN L. et SÖDERHÄLL K. : The crayfish plasma clotting protein : a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):1965–1970, 1999.
- HALL M. et SÖDERHÄLL K. : Crayfish alpha-macroglobulin as a substrate for transglutaminases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 108(1):65–72, 1994.
- HEDGES L. M., BROWNLIE J. C., O’NEILL S. L. et JOHNSON K. N. : *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322(5902):702, 2008.
- HERBINIÈRE J. : Thèse de doctorat, 2005.
- HERBINIÈRE J., BRAQUART-VARNIER C., GRÈVE P., STRUB J.-M., FRÈRE J., VAN DORSSELAER A. et MARTIN G. : Armadillidin : a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Dev Comp Immunol*, 29(6):489–499, 2005.

-
- HERBINIÈRE J., GRÈVE P., STRUB J.-M., THIERSE D., RAIMOND M., van DORSELAER A., MARTIN G. et BRAQUART-VARNIER C. : Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*. *Dev Comp Immunol*, 32(8):875–882, 2008.
- HOERAUF A., NISSEN-PÄHLE K., SCHMETZ C., HENKLE-DÜHRSEN K., BLAXTER M. L., BÜTTNER D. W., GALLIN M. Y., AL-QAoud K. M., LUCIUS R. et FLEISCHER B. : Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest*, 103(1):11–18, 1999.
- HOSE J. E., MARTIN G. G. et GERARD A. S. : A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function. *Biol Bull*, 178(1):33–45, 1990.
- HOSOKAWA T., KOGA R., KIKUCHI Y., MENG X.-Y. et FUKATSU T. : *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(2):769–774, 2010.
- HOERDEZ S., LAMONTAGNE J., PETERSON P., WEBER R. E. et FISHER C. R. : Hemoglobin from a deep-sea hydrothermal-vent copepod. *Biol Bull*, 199(2):95–99, 2000.
- HUGHES G. L., REN X., RAMIREZ J. L., SAKAMOTO J. M., BAILEY J. A., JEDLICKA A. E. et RASGON J. L. : *Wolbachia* Infections in *Anopheles gambiae* Cells : Transcriptomic Characterization of a Novel Host-Symbiont Interaction. *PLoS Pathog*, 7(2):e1001296, 2011.
- HUIGENS M. E., LUCK R. F., KLAASSEN R. H., MAAS M. F., TIMMERMAN M. J. et STOUTHAMER R. : Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405(6783):178–179, 2000.

-
- IWANAGA S. et LEE B. L. : Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol*, 38(2):128–150, 2005.
- JAENICKE E., FRAUNE S., MAY S., IRMAK P., AUGUSTIN R., MEESTERS C., DECKER H. et ZIMMER M. : Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? *Dev Comp Immunol*, 33(10):1055–1063, 2009.
- JAENIKE J. : Fighting back against male-killers. *Trends Ecol Evol*, 22(4):167–169, 2007.
- JAENIKE J., UNCKLESS R., COCKBURN S. N., BOELIO L. M. et PERLMAN S. J. : Adaptation via symbiosis : recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science*, 329(5988):212–215, 2010.
- JAMES R., THAMPURAN N., LALITHA K. V., RAJAN L. A. et JOSEPH T. C. : Differential gene expression profile of the hepatopancreas of white spot syndrome virus infected *Fenneropenaeus indicus* by suppression subtractive hybridization. *Fish Shellfish Immunol*, 29(5):884–889, 2010.
- JIANG N., TAN N. S., HO B. et DING J. L. : Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. *Nat Immunol*, 8(10):1114–1122, 2007.
- JIRAVANICHPAISAL P., LEE B. L. et SÖDERHÄLL K. : Cell-mediated immunity in arthropods : hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4):213–236, 2006.
- JOHANSSON M. W., KEYSER P., SRITUNYALUCKSANA K. et SÖDERHÄLL K. : Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3):45–52, 2000.
- JOHNSON K. N., van HULTEN M. C. W. et BARNES A. C. : "Vaccination" of shrimp against viral pathogens : phenomenology and underlying mechanisms. *Vaccine*, 26(38):4885–4892, 2008.

-
- KAISER W., HUGUET E., CASAS J., COMMINS C. et GIRON D. : Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proc Biol Sci*, 277(1692):2311–2319, 2010.
- KAMBRIS Z., COOK P. E., PHUC H. K. et SINKINS S. P. : Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, 326(5949):134–136, 2009.
- KAMBRIS Z., BLAGBOROUGH A. M., PINTO S. B., BLAGROVE M. S. C., GODFRAY H. C. J., SINDEN R. E. et SINKINS S. P. : *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*, 6(10), 2010.
- KING A. J., CRAGG S. M., LI Y., DYMOND J., GUILLE M. J., BOWLES D. J., BRUCE N. C., GRAHAM I. A. et MCQUEEN-MASON S. J. : Molecular insight into lignocellulose digestion by a marine isopod in the absence of gut microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(12):5345–5350, 2010.
- KITANO H. et ODA K. : Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system. *Mol Syst Biol*, 2:2006.0022, 2006.
- KOCHER T. D., THOMAS W. K., MEYER A., EDWARDS S. V., PÄÄBO S., VILLABLANCA F. X. et WILSON A. C. : Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(16):6196–6200, 1989.
- KOPÁČEK P., HALL M. et SÖDERHÄLL K. : Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem*, 213(1):591–597, 1993.
- KREMER N., CHARIF D., HENRI H., GAVORY F., WINCKER P., MAVINGUI P. et VAVRE F. : *Wolbachia* influence on host gene expression in an obligatory symbiosis. *BMC Microbiol*, soumis.

-
- KREMER N., VORONIN D., CHARIF D., MAVINGUI P., MOLLEREAU B. et VAVRE F. : *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*, 5(10):e1000630, 2009.
- KURTZ J. et FRANZ K. : Innate defence : evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425(6953):37–38, 2003.
- KVENNEFORS E. C. E., LEGGAT W., HOEGH-GULDBERG O., DEGNAN B. M. et BARNES A. C. : An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Dev Comp Immunol*, 32(12):1582–1592, 2008.
- LACHAT M. : Thèse de doctorat, Ingénierie Chimique Biologique et Géologique, 2009.
- LACKIE A. M. : Invertebrate immunity. *Parasitology*, 80(2):393–412, 1980.
- LAM G. Y., HUANG J. et BRUMELL J. H. : The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol*, 32(4):415–430, 2010.
- LE CLEC'H W. : Dynamique d'infection de trois souches de *Wolbachia* chez *Armadillidium vulgare*. Mémoire de Master Recherche, 2009.
- LE MOULLAC G. et HAFFNER P. : Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191(1-3):121–131, 2000.
- LEBARBENCHON C., POULIN R. et THOMAS F. : Parasitisme, biodiversité et biologie de la conservation. chapitre 7, pages 229–256. De Boeck Université, 2007. ISBN 978-2-8041-5308-3.
- LEE S. Y. et SÖDERHÄLL K. : Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Immunol*, 166(12):7319–7326, 2001.

-
- LEE S. Y., LEE B. L. et SÖDERHÄLL K. : Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem*, 278(10):7927–7933, 2003.
- LEIGH E. G. J. : The evolution of mutualism. *J Evol Biol*, 23(12):2507–2528, 2010.
- LEMAITRE B. et HOFFMANN J. : The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, 25:697–743, 2007.
- LEPELLETIER F. : Etude des endosymbiotes parasites de la reproduction chez les Isopodes terrestres. Mémoire de Master Recherche, 2009.
- LEU J. H., YANG F., ZHANG X., XU X., KOU G. H. et LO C. F. : Whispovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 328:197–227, 2009.
- LI X.-C., ZHANG R.-R., SUN R.-R., LAN J.-F., ZHAO X.-F. et WANG J.-X. : Three Kazal-type serine proteinase inhibitors from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and the characterization, function analysis of hcPcSPI2. *Fish Shellfish Immunol*, 28(5-6):942–951, 2010.
- LI Y., QIN J. G., ABBOTT C. A., LI X. et BENKENDORFF K. : Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas* : an explanation for summer mortality in *Pacific oysters*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293(6):R2353–62, 2007.
- LIGHTNER D. V. : Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev Sci Tech*, 15(2):579–601, 1996.
- LIGHTNER D. V., REDMAN R. M., POULOS B. T., NUNAN L. M., MARI J. L. et HASSON K. W. : Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Rev Sci Tech*, 16(1):146–160, 1997.

-
- LIMÓN-PACHECO J. et GONSEBATT M. E. : The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*, 674(1-2):137–147, 2009.
- LIN X. et SÖDERHÄLL I. : Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. *Blood*, 2011.
- LIN X., SÖDERHÄLL K. et SÖDERHÄLL I. : Transglutaminase activity in the hematopoietic tissue of a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, importance in hemocyte homeostasis. *BMC Immunol*, 9:58, 2008.
- LIN X., NOVOTNY M., SÖDERHÄLL K. et SÖDERHÄLL I. : Ancient cytokines, the role of astakines as hematopoietic growth factors. *J Biol Chem*, 285(37):28577–28586, 2010.
- LITTLE T. J., O’CONNOR B., COLEGRAVE N., WATT K. et READ A. F. : Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr Biol*, 13(6):489–492, 2003.
- LIU H., SÖDERHÄLL K. et JIRAVANICHPAISAL P. : Antiviral immunity in crustaceans. *Fish Shellfish Immunol*, 27(2):79–88, 2009.
- LIU H., WU C., MATSUDA Y., KAWABATA S.-I., LEE B. L., SÖDERHÄLL K. et SÖDERHÄLL I. : Peptidoglycan activation of the proPO-system without a peptidoglycan receptor protein (PGRP) ? *Dev Comp Immunol*, 35(1):51–61, 2011.
- LO N. et EVANS T. A. : Phylogenetic diversity of the intracellular symbiont *Wolbachia* in termites. *Mol Phylogenet Evol*, 44(1):461–466, 2007.
- LO N., CASIRAGHI M., SALATI E., BAZZOCCHI C. et BANDI C. : How many *Wolbachia* supergroups exist ? *Mol Biol Evol*, 19(3):341–346, 2002.

-
- LOKER E. S., ADEMA C. M., ZHANG S.-M. et KEPLER T. B. : Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev*, 198:10–24, 2004.
- LÓPEZ-MEZA J. E., OCHOA-ZARZOSA A., AGUILAR J. A. et LOEZA-LARA P. D. : Antimicrobial peptides : diversity and perspectives for their biomedical application. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, chapitre 12, pages 275–304. InTech, 2011. ISBN 978-953-307-514-3.
- MAI W.-J. et WANG W.-N. : Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. *Fish Shellfish Immunol*, 28(4):727–733, 2010.
- MANFREDINI F., BENATI D. et BEANI L. : The strepsipteran endoparasite *Xenos vesparum* alters the immunocompetence of its host, the paper wasp *Polistes dominulus*. *J Insect Physiol*, 56(3):253–259, 2010.
- MARCHLER-BAUER A., LU S., ANDERSON J. B., CHITSAZ F., DERBYSHIRE M. K., DEWEESE-SCOTT C., FONG J. H., GEER L. Y., GEER R. C., GONZALES N. R., GWADZ M., HURWITZ D. I., JACKSON J. D., KE Z., LANCZYCKI C. J., LU F., MARCHLER G. H., MULLOKANDOV M., OMELCHENKO M. V., ROBERTSON C. L., SONG J. S., THANKI N., YAMASHITA R. A., ZHANG D., ZHANG N., ZHENG C. et BRYANT S. H. : CDD : a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue):D225–9, 2011.
- MARSHALL O. J. : PerlPrimer : cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15):2471–2472, 2004.
- MARTIN G. et DUBOIS M. P. : A somatostatin-like antigen in the nervous system of an isopod *Porcellio dilatatus* Brandt. *Gen Comp Endocrinol*, 45(1):125–130, 1981.

-
- MARTIN G., JUCHAULT P. et LEGRAND J. J. : Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* L. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 276:2313–2316, 1973.
- MARTIN G. G., HOSE J. E. et KIM J. J. : Structure of hematopoietic nodules in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* : Light and electron microscopic observations. *Journal of Morphology*, 192(3):193–204, 1987.
- MATOZZO V. et MARIN M. G. : The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses : A first survey. *Fish Shellfish Immunol*, 28(4):534–541, 2010.
- McFALL-NGAI M., NYHOLM S. V. et CASTILLO M. G. : The role of the immune system in the initiation and persistence of the Euprymna scolopes–*Vibrio fischeri* symbiosis. *Semin Immunol*, 22(1):48–53, 2010.
- MCGRAW E. A., MERRITT D. J., DROLLER J. N. et O'NEILL S. L. : *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):2918–2923, 2002.
- MCTAGGART S. J., CONLON C., COLBOURNE J. K., BLAXTER M. L. et LITTLE T. J. : The components of the *Daphnia pulex* immune system as revealed by complete genome sequencing. *BMC Genomics*, 10:175, 2009.
- MENZE M. A., FORTNER G., NAG S. et HAND S. C. : Mechanisms of apoptosis in Crustacea : What conditions induce versus suppress cell death ? *Apoptosis*, 15(3):293–312, 2010.
- MERÇOT H. et POINSOT D. : Infection by *Wolbachia* : from passengers to residents. *C R Biol*, 332(2-3):284–297, 2009.

-
- MILLER G. A., PELL J. K. et SIMPSON S. J. : Crowded locusts produce hatchlings vulnerable to fungal attack. *Biol Lett*, 5(6):845–848, 2009.
- MIN K. T. et BENZER S. : *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20):10792–10796, 1997.
- MONNIER J. et SAMSON M. : Cytokine properties of prokineticins. *FEBS J*, 275(16):4014–4021, 2008.
- MOREIRA L. A., ITURBE-ORMAETXE I., JEFFERY J. A., LU G., PYKE A. T., HEDGES L. M., ROCHA B. C., HALL-MENDELIN S., DAY A., RIEGLER M., HUGO L. E., JOHNSON K. N., KAY B. H., MCGRAW E. A., van den HURK A. F., RYAN P. A. et O’NEILL S. L. : A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 139(7):1268–1278, 2009.
- MORET Y., JUCHAULT P. et RIGAUD T. : *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean : effects in natural and foreign hosts. *Heredity*, 86(Pt 3):325–332, 2001.
- MORET Y. et SIVA-JOTHY M. T. : Adaptive innate immunity ? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc Biol Sci*, 270(1532):2475–2480, 2003.
- MORGA B., ARZUL I., CHOLLET B. et RENAULT T. : Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies in vitro haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol*, 26(6):836–842, 2009.
- NAKAMURA Y., GOTOH T., IMANISHI S., MITA K., KURTTI T. J. et NODA H. : Differentially expressed genes in silkworm cell cultures in response to infection by *Wolbachia* and *Cardinium* endosymbionts. *Insect Mol Biol*, 2011.

-
- NAPPI A. J. et CHRISTENSEN B. M. : Melanogenesis and associated cytotoxic reactions : applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 35 (5):443–459, 2005.
- NAPPI A. J., FREY F. et CARTON Y. : *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *J Insect Physiol*, 51(2):197–205, 2005.
- O’NEILL S. L., GIORDANO R., COLBERT A. M., KARR T. L. et ROBERTSON H. M. : 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7):2699–2702, 1992.
- O’NEILL S. L., HOFFMANN A. A. et WERREN J. H. : Oxford University Press, 1997. ISBN 9780198577867.
- ONG S. T., HO J. Z. S., HO B. et DING J. L. : Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology*, 211(4):295–314, 2006.
- OSBORNE S. E., LEONG Y. S., O’NEILL S. L. et JOHNSON K. N. : Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathog*, 5(11):e1000656, 2009.
- PANNEBAKKER B. A., LOPPIN B., ELEMANS C. P. H., HUMBLLOT L. et VAVRE F. : Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1):213–215, 2007.
- PFAFFL M. W. : A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45, 2001.
- PFAFFL M. W., HORGAN G. W. et DEMPFLER L. : Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30(9):e36, 2002.

-
- PICHON S., BOUCHON D., LIU C., CHEN L., GARRETT R. A. et GRÈVE P. : Specific expression of one ankyrin pk2 allele of the WO prophage in feminizing *Wolbachia* strains. *BMC Microbiol*, soumis.
- PLESS D. D., AGUILAR M. B., FALCÓN A., LOZANO-ALVAREZ E. et Heimer de la COTERA E. P. : Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Arch Biochem Biophys*, 409(2):402–410, 2003.
- PONTES M., SMITH K., SMITH W. et DALE C. : Insect facultative symbionts : biology, culture, and genetic modification. *Insect Symbiosis*, volume 3, chapitre 18, pages 377–395. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2008. ISBN 978-1-4200-6410-0.
- PRAPAVORARAT A., VATANAVICHARN T., SÖDERHÄLL K. et TASSANAKAJON A. : A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *J Biol Chem*, 285(28):21467–21477, 2010.
- RASGON J. L., GAMSTON C. E. et REN X. : Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Appl Environ Microbiol*, 72(11):6934–6937, 2006.
- REBER A., CASTELLA G., CHRISTE P. et CHAPUISAT M. : Experimentally increased group diversity improves disease resistance in an ant species. *Ecol Lett*, 11(7):682–689, 2008.
- REYNOLDS E. S. : The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 17:208–212, 1963.
- RIGAUD T., PENNINGS P. S. et JUCHAULT P. : *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. *J Invertebr Pathol*, 77(4):251–257, 2001.
- RIGAUD T. et JUCHAULT P. : Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J. evol. Biol.*, 8(2):249–255, 1995.

-
- RIGAUD T., SOUTY-GROSSET C., RAIMOND R., MOCQUARD J.-P. et JUCHAULT P. : Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (isopoda) : recent acquisitions. *Endocytobiosis & Cell Res*, 7:259–273, 1991.
- RIVERO A. : Nitric oxide : an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol*, 22(5):219–225, 2006.
- ROBALINO J., BARTLETT T. C., CHAPMAN R. W., GROSS P. S., BROWDY C. L. et WARR G. W. : Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp : inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Dev Comp Immunol*, 31(6):539–547, 2007.
- RODRIGUEZ J., BOULO V., MIALHE E. et BACHERE E. : Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J Cell Sci*, 108:1043–1050, 1995.
- RODRÍGUEZ-RAMOS T., CARPIO Y., BOLÍVAR J., ESPINOSA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., GOLLAS-GALVÁN T., RAMOS L., PENDÓN C. et ESTRADA M. P. : An inducible nitric oxide synthase (NOS) is expressed in hemocytes of the spiny lobster *Panulirus argus* : cloning, characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol*, 29(3):469–479, 2010.
- ROTH O. et KURTZ J. : Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea : Isopoda). *Dev Comp Immunol*, 33(11):1151–1155, 2009.
- ROUSSET F., BOUCHON D., PINTUREAU B., JUCHAULT P. et SOLIGNAC M. : *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc Biol Sci*, 250(1328):91–98, 1992.
- SABIN L. R., HANNA S. L. et CHERRY S. : Innate antiviral immunity in *Drosophila*. *Current Opinion in Immunology*, 22(1):4–9, 2010. Innate immunity [filled circle] Antigen processing.

-
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. et MANIATIS T. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, 1989.
- SARIDAKI A. et BOURTZIS K. : *Wolbachia* : more than just a bug in insects genitals. *Curr Opin Microbiol*, 13(1):67–72, 2010.
- SCHULENBURG H., BOEHNISCH C. et MICHIELS N. K. : How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol Immunol*, 44(13):3338–3344, 2007.
- SCHULENBURG H., KURTZ J., MORET Y. et SIVA-JOTHY M. T. : Introduction. Ecological immunology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1513):3–14, 2009.
- SERBUS L. R., CASPER-LINDLEY C., LANDMANN F. et SULLIVAN W. : The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet*, 42:683–707, 2008.
- SHAI Y. : Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1462(1-2):55–70, 1999.
- SICARD M., CHEVALIER F., DE VLECHOUVER M., BOUCHON D., GRÈVE P. et BRAQUART-VARNIER C. : Variations of immune parameters in terrestrial isopods : a matter of gender, aging and *Wolbachia*. *Naturwissenschaften*, 97(9):819–826, 2010.
- SIOZIOS S., SAPOUNTZIS P., IOANNIDIS P. et BOURTZIS K. : *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. *Insect Science*, 15(1):89–100, 2008.
- SIVA-JOTHY M. T. : 'Immunocompetence' : conspicuous by its absence. *Trends Ecol Evol*, 10(5):205–206, 1995.

-
- SMITH V. J. et SÖDERHÄLL K. : A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev Comp Immunol*, 15(4):251–261, 1991.
- SMITH V. J., FERNANDES J. M. O., KEMP G. D. et HAUTON C. : Crustins : enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev Comp Immunol*, 32(7):758–772, 2008.
- SOONTHORNCHAI W., RUNGRASSAMEE W., KAROONUTHAISIRI N., JARAYABHAND P., KLINBUNGA S., SÖDERHÄLL K. et JIRAVANICHPAISAL P. : Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. *Dev Comp Immunol*, 34(1):19–28, 2010.
- SRICHAROEN S., KIM J. J., TUNKIJJANUKIJ S. et SÖDERHÄLL I. : Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish. *Dev Comp Immunol*, 29(12):1017–1031, 2005.
- SRIPHAJIT T., FLEGEL T. W. et SENAPIN S. : Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. *Dev Comp Immunol*, 31(11):1145–1158, 2007.
- SRITUNYALUCKSANA K., WONGSUEBSANTATI K., JOHANSSON M. W. et SÖDERHÄLL K. : Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 25(5-6):353–363, 2001.
- STOUTHAMER R., BREEUWER J. A. et HURST G. D. : *Wolbachia pipientis* : microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol*, 53:71–102, 1999.
- SÖDERHÄLL I., BANGYEEKHUN E., MAYO S. et SÖDERHÄLL K. : Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal ; proliferation and gene expression

-
- in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Dev Comp Immunol*, 27 (8):661–672, 2003.
- SÖDERHÄLL I., KIM Y.-A., JIRAVANICHPAISAL P., LEE S.-Y. et SÖDERHÄLL K. : An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis. *J Immunol*, 174(10):6153–6160, 2005.
- SÖDERHÄLL I., WU C., NOVOTNY M., LEE B. L. et SÖDERHÄLL K. : A novel protein acts as a negative regulator of prophenoloxidase activation and melanization in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem*, 284(10):6301–6310, 2009.
- TANG K. F. J. et LIGHTNER D. V. : Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res*, 118(1-2):185–191, 2006.
- TASSANAKAJON A., AMPARYUP P., SOMBOONWIWAT K. et SUPUNGUL P. : Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Mar Biotechnol (NY)*, 12(5):487–505, 2010.
- TAYLOR M. J., BANDI C. et HOERAUF A. : *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv Parasitol*, 60:245–284, 2005.
- TEIXEIRA L., FERREIRA A. et ASHBURNER M. : The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, 6(12):e2, 2008.
- TERWILLIGER N. B. : Hemocyanins and the immune response : defense against the dark arts. *Integr. Comp. Biol.*, 47:662–665, 2007.
- THEOPOLD U., LI D., FABBRI M., SCHERFER C. et SCHMIDT O. : The coagulation of insect hemolymph. *Cell Mol Life Sci*, 59(2):363–372, 2002.

-
- THOMAS F., GUÉGAN j.-F. et RENAUD F. : De Boeck Université, 2007. ISBN 978-2-8041-5308-3.
- THOMAS P., KENNY N., EYLES D., MOREIRA L. A., O'NEILL S. L. et ASGARI S. : Infection with the *w*Mel and *w*MelPop strains of *Wolbachia* leads to higher levels of melanization in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Aedes aegypti*. *Dev Comp Immunol*, 35(3):360–365, 2011.
- THOMAS S., KARNIK S., BARAI R. S., JAYARAMAN V. K. et IDICULA-THOMAS S. : CAMP : a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res*, 2009.
- THRALL P. H., HOCHBERG M. E., BURDON J. J. et BEVER J. D. : Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends Ecol Evol*, 22(3):120–126, 2007.
- TRANIELLO J. F. A., ROSENGAUS R. B. et SAVOIE K. : The development of immunity in a social insect : evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10):6838–6842, 2002.
- VAINIO L., HAKKARAINEN H., RANTALA M. et SORVARI J. : Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta* ; effects of the nest, body size and sex. *Evolutionary Ecology*, 18:75–84, 2004. 10.1023/B :EVEC.0000017726.73906.b2.
- VAN VALEN L. : A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1(1):1–30, 1973.
- VAVRE F., GIRIN C. et BOULÉTREAU M. : Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Mol Biol*, 8(1):67–72, 1999.
- VAZQUEZ L., ALPUCHE J., MALDONADO G., AGUNDIS C., PEREYRA-MORALES A. et ZENTENO E. : Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immun*, 15(3):179–188, 2009.

-
- VERNE S., JOHNSON M., BOUCHON D. et GRANDJEAN F. : Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene*, 397(1-2):58–66, 2007.
- VIGNERON A., CHARIF D., VALLIER A., VINCENT-MONEGAT C., GAVORY F., WINCKER P. et HEDDI A. : Host response to endosymbiont and pathogen in the cereal weevil *Sitophilus oryzae*. *BMC Microbiol*, soumis.
- VIVARÈS C. P. : Les microsporidies : un regain d'intérêt pour ces curieux parasites. *L'Année biologique*, 38:1–16, 1999.
- WANG C. Q., JACOB B., NAH G. S. S. et OSATO M. : Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood Cells Mol Dis*, 44(4):275–286, 2010.
- WANG J. et XIA Y. : Construction and preliminary analysis of a normalized cDNA library from *Locusta migratoria manilensis* topically infected with *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *J Insect Physiol*, 56(8):998–1002, 2010.
- WANG P.-H., GU Z.-H., HUANG X.-D., LIU B.-D., DENG X.-x., AI H.-S., WANG J., YIN Z.-X., WENG S.-P., YU X.-Q. et HE J.-G. : An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes. *Mol Immunol*, 46(8-9):1897–1904, 2009a.
- WANG X.-W., XU W.-T., ZHANG X.-W., ZHAO X.-F., YU X.-Q. et WANG J.-X. : A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 27(4):556–562, 2009b.
- WATTHANASUROROT A., SÖDERHÄLL K., JIRAVANICHPAISAL P. et SÖDERHÄLL I. : An ancient cytokine, astakine, mediates circadian regulation of invertebrate hematopoiesis. *Cell Mol Life Sci*, 68(2):315–323, 2011.
- WELCHMAN D. P., AKSOY S., JIGGINS F. et LEMAITRE B. : Insect Immunity : From Pattern Recognition to Symbiont-Mediated Host Defense. *Cell Host Microbe*, 6(2):107–114, 2009.

-
- WERREN J. H. : Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*, 42:587–609, 1997.
- WERREN J. H., ZHANG W. et GUO L. R. : Evolution and phylogeny of *Wolbachia* : reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci*, 261(1360):55–63, 1995.
- WERREN J. H., BALDO L. et CLARK M. E. : *Wolbachia* : master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*, 6(10):741–751, 2008.
- WIWATANARATANABUTR I., KITTAYAPONG P., CAUBET Y. et BOUCHON D. : Molecular phylogeny of *Wolbachia* strains in arthropod hosts based on groE-homologous gene sequences. *Zoolog Sci*, 26(2):171–177, 2009.
- XI Z., GAVOTTE L., XIE Y. et DOBSON S. L. : Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host. *BMC Genomics*, 9:1, 2008.
- XIE J., VILCHEZ I. et MATEOS M. : *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS One*, 5(8):e12149, 2010.
- YANO T. et KURATA S. : Induction of autophagy via innate bacterial recognition. *Autophagy*, 4(7):958–960, 2008.
- YEH M. S., HUANG C. J., LEU J. H., LEE Y. C. et TSAI I. H. : Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Eur J Biochem*, 266(2):624–633, 1999.
- YOSHIDA T., NAKAMURA H., MASUTANI H. et YODOI J. : The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process. *Ann N Y Acad Sci*, 1055:1–12, 2005.
- ZELENSKY A. N. et GREARY J. E. : The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*, 272(24):6179–6217, 2005.

Publications

The Immune Cellular Effectors of Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*: Meeting with Their Invaders, *Wolbachia*

Frédéric Chevalier¹*, Juline Herbinière-Gaboreau¹*, Joanne Bertaux¹, Maryline Raimond¹, Franck Morel², Didier Bouchon¹, Pierre Grève¹, Christine Braquart-Varnier^{1*}

1 Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, UMR CNRS 6556, Poitiers, France, **2** Université de Poitiers, Laboratoire Inflammation, Tissus Epitheliaux et Cytokines, EA 4331, Poitiers, France

Abstract

Background: Most of crustacean immune responses are well described for the aquatic forms whereas almost nothing is known for the isopods that evolved a terrestrial lifestyle. The latter are also infected at a high prevalence with *Wolbachia*, an endosymbiotic bacterium which affects the host immune system, possibly to improve its transmission. In contrast with insect models, the isopod *Armadillidium vulgare* is known to harbor *Wolbachia* inside the haemocytes.

Methodology/Principal Findings: In *A. vulgare* we characterized three haemocyte types (TEM, flow cytometry): the hyaline and semi-granular haemocytes were phagocytes, while semi-granular and granular haemocytes performed encapsulation. They were produced in the haematopoietic organs, from central stem cells, maturing as they moved toward the edge (TEM). In infected individuals, live *Wolbachia* (FISH) colonized 38% of the haemocytes but with low, variable densities (6.45 ± 0.46 *Wolbachia* on average). So far they were not found in hyaline haemocytes (TEM). The haematopoietic organs contained $7.6 \pm 0.7 \times 10^3$ *Wolbachia*, both in stem cells and differentiating cells (FISH). While infected and uninfected one-year-old individuals had the same haemocyte density, in infected animals the proportion of granular haemocytes in particular decreased by one third (flow cytometry, Pearson's test = 12 822.98, $df = 2$, $p < 0.001$).

Conclusions/Significance: The characteristics of the isopod immune system fell within the range of those known from aquatic crustaceans. The colonization of the haemocytes by *Wolbachia* seemed to stand from the haematopoietic organs, which may act as a reservoir to discharge *Wolbachia* in the haemolymph, a known route for horizontal transfer. *Wolbachia* infection did not affect the haemocyte density, but the quantity of granular haemocytes decreased by one third. This may account for the reduced prophenoloxidase activity observed previously in these animals.

Citation: Chevalier F, Herbinière-Gaboreau J, Bertaux J, Raimond M, Morel F, et al. (2011) The Immune Cellular Effectors of Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*: Meeting with Their Invaders, *Wolbachia*. PLoS ONE 6(4): e18531. doi:10.1371/journal.pone.0018531

Editor: David M. Ojcius, University of California Merced, United States of America

Received: December 3, 2010; **Accepted:** March 10, 2011; **Published:** April 20, 2011

Copyright: © 2011 Chevalier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by the CNRS, the University of Poitiers (Action Incitative: Diversité bactérienne et immunocompétence des hôtes) and the Agence Nationale de la Recherche (EndoSymbArt ANR-06-BLAN-0316 - ADaWOL ANR-09-JCJC-0109). FC and JHG were supported by a fellowship from the French Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: christine.braquart@univ-poitiers.fr

☞ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Lacking the memory of vertebrate immunity, invertebrates largely depend upon their innate defensive mechanisms to protect themselves against pathogens and invading organisms. Immune cellular responses include early non-self recognition [1], phagocytosis, cellular encapsulation and nodulation [1–3]. Immune humoral responses involve clotting and coagulation reactions [3,4], the production of antimicrobial peptides [5] and the prophenoloxidase cascade [6]. In crustaceans all these processes are conducted by, or originate from haemocytes which are considered as the cornerstone of their immune system [3,7,8].

Most of our knowledge on crustacean immune system stands from decapods, such as freshwater crayfishes, shrimps or crabs

which live in aquatic ecosystems. Meanwhile, some isopods (Oniscidae) have evolved a terrestrial lifestyle, which could have impacted their immune system. The latter could thus stand closer to that of other terrestrial arthropods because of similar environmental constraints during their evolution. But for now, the immune system of such terrestrial crustaceans remains poorly described. Concerning the cellular effectors, to this date nothing has been published on the different haemocyte types and their origins. Regarding molecular effectors, only a few papers have been published since 2005 [9–12]. In *Armadillidium vulgare*, an antimicrobial peptide acting against Gram positive bacteria was characterized [9] as well as numerous proteins known to be involved in both aspects of the immune response in crustacean decapods and other arthropods [10]. In *Porcellio scaber*, hemocyanin is suggested to fulfil functions of phenoloxidase in addition to

serving as a respiratory pigment [11]. In the same species phagocytosis is highly specific upon priming [12], which supports a potentially important role of phagocytes in specific immune responses of invertebrates.

Studying the immunity of terrestrial isopods is also of particular interest to decipher host/symbiont interactions, because they are infected by *Wolbachia* endosymbionts at a high prevalence (62% of terrestrial isopod species are infected [13]). *Wolbachia* are strictly intracellular α -proteobacteria closely related to important human pathogens such as *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *Cowdria* [14]. They are maternally inherited symbionts widespread among arthropods and filarial nematodes, probably the most abundant endosymbionts of invertebrates [15,16]. Such a ubiquity and the wide occurrence of lateral transfers inferred from host/*Wolbachia* comparative phylogenies [17–20] suggest that, to improve their own transmission, successful spreading and persistence among host populations, *Wolbachia* are able to avoid and/or to manipulate the host immune system. Indeed, *Wolbachia* manipulate *Aedes albopictus* host antioxidant systems in a manner that is beneficial to its survival [21]. In *Drosophila melanogaster*, *Ae. aegypti* and *Culex pipiens*, *Wolbachia* confer resistance against viruses such as dengue, chikungunya and the West Nile virus but also against the protozoan *Plasmodium* [22–26]. In contrast, *Wolbachia* immunodepress *D. simulans* hosts, resulting in less efficient encapsulation of parasitic wasp eggs [27]. In *A. vulgare*, *Wolbachia* infection is associated with immunodepression [28,29]: the phenoloxidase activity is reduced while the titer of culturable bacteria (i.e. not *Wolbachia*) in the haemolymph increases and the haemocyte density decreases in older specimens.

In this study, we characterized the immune cellular effectors of *A. vulgare* and report for the first time that infected animals, while having normal haemocyte densities, displayed different proportions of haemocyte types. Outstandingly, *A. vulgare* is the only known model system in which *Wolbachia* have been found in haemocytes [28,30]. We have quantified the extent of such a colonization, and found that the *Wolbachia* were already present in the haematopoietic organs where haemocytes are synthesized and differentiate.

Results

Morphological characterization of three haemocyte types

Three haemocyte types were revealed by TEM (Transmission Electron Microscopy): hyaline, semi-granular and granular. Hyaline haemocytes (Fig. 1.A) were relatively small (8 $\mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ on average), agranular (or with few granules) and had a high nucleocytoplasmic ratio. The cytoplasm was filled with round electron-dense deposits as well as with rough endoplasmic reticulum (RER), free ribosomes and mitochondria. This haemocyte type represented 7% of the total haemocyte population in the haemolymph (TEM sampled cells: $n = 58$). Semi-granular haemocytes (Fig. 1.B) were larger (12 $\mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ on average) and contained abundant, small electron-dense granules ($\varnothing$ 0.6 to 0.8 μm on average) which presented a homogenous structure. The nucleocytoplasmic ratio was lower than in the hyaline cells. The semi-granular type represented 72% of the total haemocyte population in the haemolymph (TEM sampled cells: $n = 58$). The granular haemocytes (Fig. 1.C) were as large as semi-granular ones but contained abundant, large electron-dense granules ($\varnothing$ 0.6 to 1.6 μm on average). Golgi apparatus, RER and mitochondria were present in the cytoplasm of both kinds of granular cells. This haemocyte type represented 21% of the total haemocyte population in the haemolymph (TEM sampled cells: $n = 58$).

Flow cytometry analysis of circulating haemocyte populations of uninfected animals

Based on cell size (forward scatter FSC) and internal cell complexity (side scatter SSC), live circulating haemocytes were divided in two populations, accounting for 73% (P1: FSC $4.7 \pm 1.2 \times 10^4$, SSC $4.0 \pm 5.4 \times 10^4$) and 18% (P2: FSC $4.0 \pm 1.1 \times 10^4$, SSC $1.2 \pm 0.1 \times 10^5$) of the total circulating haemocytes, respectively (Fig. 2). Dead cells (9%), labelled with propidium iodide, were ignored. The same populations were recovered as two separate bands from gradient centrifugation. From TEM observations, P1 comprised 13% of hyaline haemocytes and 87% of semi-granular haemocytes (sampled cells $n = 31$), while only granular haemocytes were found in P2 (sampled cells $n = 26$) (Fig. 2).

Assignment of phagocytosis and encapsulation functions

In vivo phagocytosis experiments. In *A. vulgare* ink particles were used to identify phagocytes, which were in majority hyaline haemocytes and in a lower proportion semi-granular haemocytes (Fig. 3). In these cells, numerous lysosomes containing ink particles but also primary endosome could be observed. Ink particles were never found in granular haemocytes.

In vivo encapsulation experiments. Resin bits were used to determine the haemocyte type involved in encapsulation. Eight days after implantation, the bits, recovered from the haemocoel, were layered with haemocytes. The capsules resembled a net of strips fitted together, formed by the stretched and joined haemocytes. In the first layers, the cells were much flattened, the nuclei and cytoplasm organelles had disappeared (Fig. 4.A). New haemocytes, not yet stretched, were recruited at the periphery. Semi-granular cells, as per the abundant and small electron-dense granules in their cytoplasm, were the most involved in encapsulation. Melanization products, detected in the haemocyte stacks after eight days (Fig. 4.B), showed the local release of proteins stored in the granules. Some haemocytes presented the formation of myelin bodies and a specific dissociation of the nucleus characteristic of apoptosis (Fig. 4.B).

Structure of the haematopoietic organs

The six haematopoietic organs were 150 μm long, 150 μm large and 50 to 60 μm thick (Fig. 5.A). Each was wrapped in connective tissue limited by a basal membrane. They contained only haemocytes presenting different maturation stages, the least mature being in the central area. There, haemocytes were isolated and steeped in matrix, some had a large nucleus or condensed chromatin, and some were dividing (Fig. 5.B–D). The central area was surrounded by a zone with a lower cell density and then the cortex. The latter was interrupted by irregular ramifications projecting from the low density zone and presented a high cellular density. The cells were larger and their migration to the basal lamina was accompanied by maturation and differentiation. The cortex could be divided into three parts: internal, central and external. In the internal cortex, the cells adhered to each others, were organized and seemed undifferentiated. From the central cortex on, cells with and without granules could be distinguished (Fig. 5.E). Whatever the type, the cell structure was similar: a large nucleus, a reduced cytoplasm, a lot of mitochondria and a well-developed endoplasmic reticulum. In the external cortex, the cells containing granules were more numerous than those without (Fig. 5.F). The two granular haemocyte types could not be discriminated. Diapedesis figures were observed (Fig. 5.G).

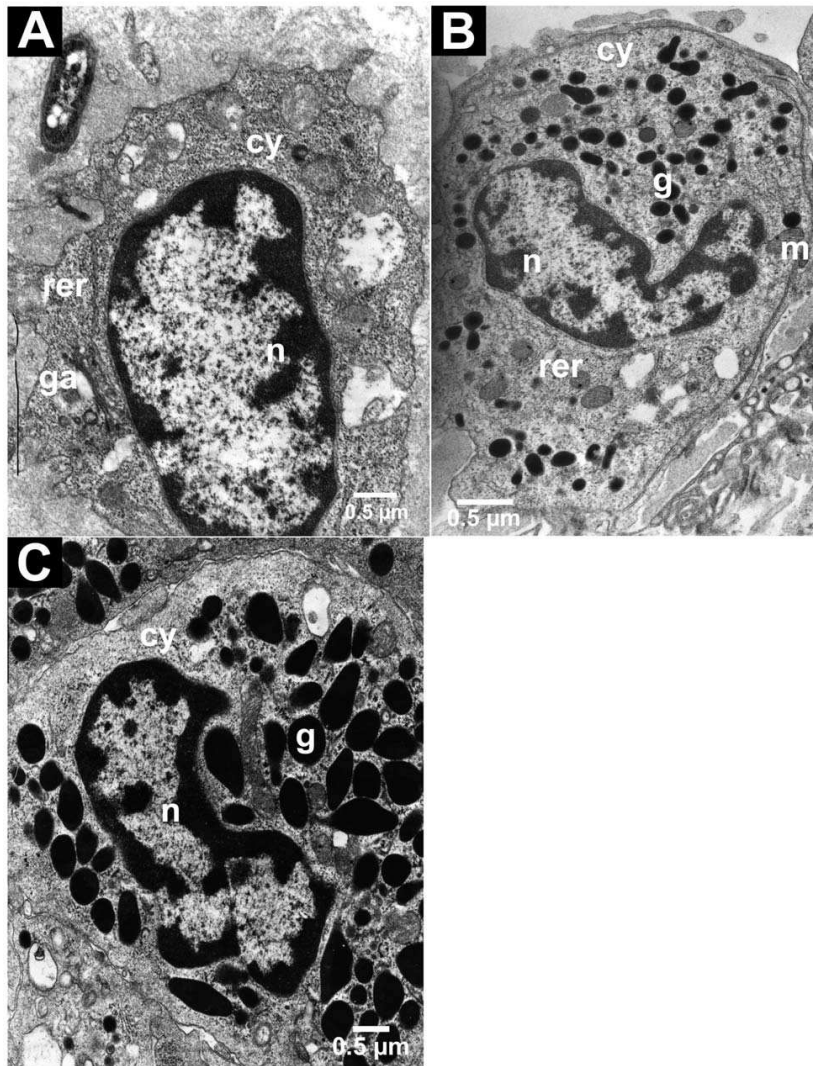


Figure 1. TEM characterization of three haemocyte types. The hyaline type (A) did not contain granules, contrary to the semi-granular (B) and granular (C) types. n: nucleus, cy: cytoplasm, g: granules, m: mitochondria, ga: Golgi apparatus, rer: rough endoplasmic reticulum.
doi:10.1371/journal.pone.0018531.g001

Wolbachia infection in haemocytes and haematopoietic organs

Wolbachia were observed by TEM in haematopoietic organ cells with granules, and in granular and semi-granular circulating haemocytes (Fig. 6). The bacteria were included in a vacuole and did not seem to be undergoing any type of degradation process. Their 16S rRNA were detectable by FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) (Fig. 7A–F).

In the five infected animals (Fig. 7A–B) 35 to 53% of haemocytes were FISH positive. The mean infection rate was 42% ($n = 1\,002$ haemocytes). Enumerating the *Wolbachia* themselves was not possible because they often clustered together: instead we measured the cumulated volumes of their fluorescence. The fluorescence of a non-clustering coccoid *Wolbachia* was $0.88\ \mu\text{m}^3$ (95% confidence interval: [0.73–1.06]) with no variation

between sampled females (ANOVA $F_{2,37} = 1.36$, $p = 0.2678$), therefore volumes in μm^3 are approximately equivalent to *Wolbachia* numbers. Based on this estimate, colonized haemocytes contained 6.45 ± 0.46 *Wolbachia* on average (range 0.3–24.5, in a subsample of 144 haemocytes). In uninfected animals, fluorescent objects that could be mistaken for *Wolbachia* were observed in 4% of the haemocytes ($n = 723$, Fig. 7G–H). The volume of these artefacts was $2.65 \pm 0.41\ \mu\text{m}^3$ and was thus much lower than the *Wolbachia* signals (BoxCox transformed data, $t = -4.20$, $df = 169$, $p < 0.001$). Since similar artefacts could have contributed to the *Wolbachia* counts, a better estimation of *Wolbachia* haemocyte colonization, excluding artefacts, would be 38%.

The haematopoietic organ nodules contained $7.6 \pm 0.7 \times 10^3$ *Wolbachia*, as estimated from their fluorescence volume (Fig. 7C). The resolution was not sufficient to discriminate the cell borders

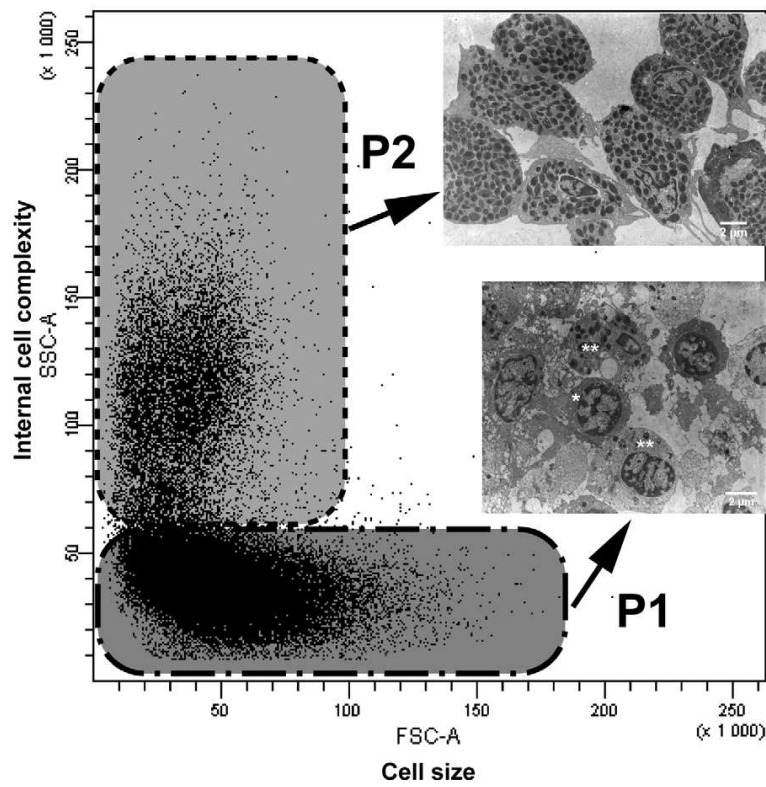


Figure 2. Separation of circulating haemocyte populations. The flow cytometry FSC vs. SSC dotplot shows two populations: P1 and P2. After separation on a Percoll gradient, TEM confirmed that P1 contained few hyaline (*) and semi-granular haemocytes (**) and P2 only granular haemocytes. P1 and P2 ellipses drawn manually.
doi:10.1371/journal.pone.0018531.g002

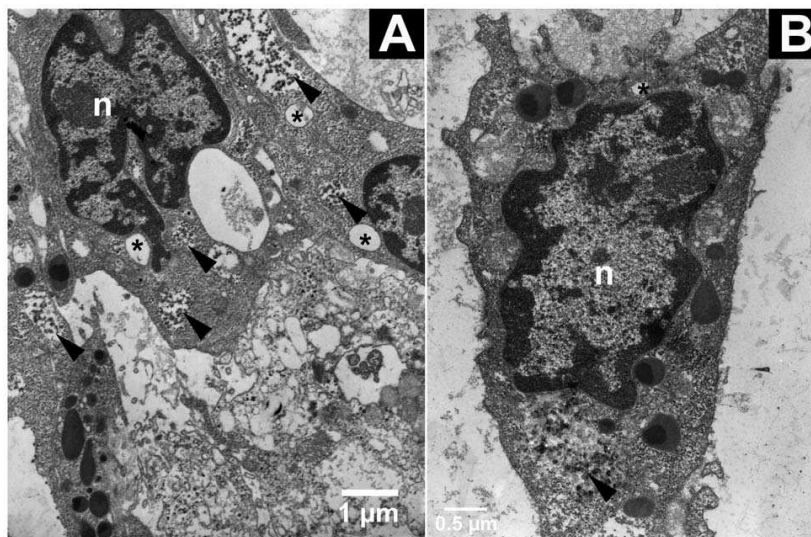


Figure 3. Phagocytosed ink particles within lysosomes in haemocytes (TEM). Ink particles were observed in lysosomes (arrowhead) from hyaline (A) and semi-granular haemocyte (B). n: nucleus, arrowhead: ink particles in a lysosome, asterisk: primary endosome.
doi:10.1371/journal.pone.0018531.g003

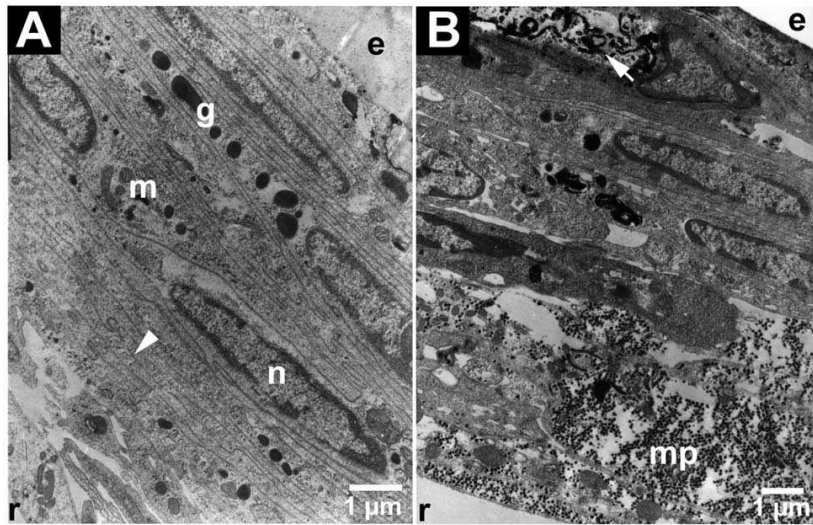


Figure 4. Resin bit encapsulated by haemocytes (TEM). **A:** Semi-granular haemocytes were being recruited at the periphery of the capsule. Some haemocytes in the capsule had lost nucleus and organelles (arrowhead). r: resin side of the capsule, e: external side of the capsule, n: nucleus, g: granules, m: mitochondria. **B:** The capsule was made of several layers of haemocytes, some of them being in an apoptotic stage (arrow). Melanin particles (mp) were released on the resin side.
doi:10.1371/journal.pone.0018531.g004

and enumerate the bacteria in each cell, but it was possible to distinguish the central area from the cortex thanks to the gap in between. The proportion of colonized area was 1% in both parts (Arcsine square-root transformed data ANOVA: zone effect: $F_{1,19} = 0.8771$, $p = 0.36$; infection status effect: $F_{1,19} = 268$, $p < 0.001$; interaction infection status $\times$ zone: $F_{1,19} = 0.0009$, $p = 0.9759$). Not all the cells were colonized, in both zones (Fig. 7.D–F): some areas of several neighbouring cells were devoid of bacteria. The number of *Wolbachia* per cell seemed extremely variable. Very occasionally, they clustered in high numbers around the nucleus in haemocytes from the cortex periphery. The background fluorescence recorded from uninfected animals (Fig. 7.I) was comparatively low (whole organ: $0.1 \pm 0.05 \times 10^3$; central area: $0.002 \pm 0.002 \times 10^3$; cortex: $0.10 \pm 0.05 \times 10^3 \mu\text{m}^3$).

Perturbation of haemocyte proportions in *Wolbachia*-infected animals

In one-year old infected animals, the mean number of circulating haemocytes ($2.1 \pm 0.4 \times 10^4$ cells/ μl haemolymph; $n = 14$) was the same as the one observed in uninfected animals of the same age ($3.2 \pm 0.4 \times 10^4$ cells/ μl haemolymph; $n = 14$, $t = -1.88$, $df = 26$, $p = 0.0804$). The haemocytes of populations P1 (FSC $4.7 \pm 1.2 \times 10^4$, SSC $4.0 \pm 0.5 \times 10^4$) and P2 (FSC $4.0 \pm 1.1 \times 10^4$, SSC $2.0 \pm 1.6 \times 10^4$) resembled those of uninfected animals in internal complexity and size (P1-FSC: $t = 0.12$, $df = 25$, $p = 0.9039$; P2-FSC: $t = -0.34$, $df = 25$, $p = 0.7373$; P1-SSC: $t = -1.44$, $df = 25$, $p = 0.1628$; P2-SSC: Wilcoxon's test = 0.54, $df = 1$, $p = 0.4642$) but the proportion of the populations differed (Pearson's test = 12 822.98, $df = 2$, $p < 0.001$), with 12% of granular haemocytes (P2), 76% of hyaline and semi-granular haemocytes (P1) and 12% of dead cells.

Discussion

The immune cellular effectors of *Armadillidium vulgare*....

In invertebrates, circulating haemocytes are central to the innate immune system, being involved in phagocytosis and

encapsulation. They are also vehicles for other immune functions such as the generation of reactive oxygen and nitrogen species, as well as the production of antimicrobial peptides and enzymes involved in the phenoloxylase (PO) cascade [1,31].

In most crustacean species, the haemocyte classification is based on the presence/absence of cytoplasmic granules. Following this methodology, three types of circulating haemocytes are usually recognized [7]: hyaline haemocytes without evident granules and a high nucleo-cytoplasmic ratio, semi-granular haemocytes harbouring a variable number of small granules in their cytoplasm, and granular haemocytes with numerous large granules. In the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*, we clearly observed these three types of haemocytes as described in shrimps [32,33], in freshwater crayfishes and in crabs [34,35].

Each haemocyte type is thought to have a dominating function. Because the cytoplasmic granules of crustacean haemocytes contain the humoral proteins (agglutinins, peroxinectins, enzymes of the coagulation and the PO cascade, antimicrobial peptides [36]), their presence is easily associated with coagulation and encapsulation. Phagocytosis is trickier to assign. In shrimps, semi-granular and granular haemocytes are able to phagocyte yeast particles *in vitro*, but not hyaline haemocytes [33,37]. In contrast, only the hyaline haemocytes can phagocyte latex beads *in vitro* [38]. In the freshwater crayfish, all haemocyte types show some phagocytic response but only the semi-granular ones are involved in the phagocytosis of all foreign particles used in the *in vivo* assay [39]. In *A. vulgare*, the China ink particles were phagocytosed by the hyaline haemocytes and some semi-granular haemocytes. The resin bits were encapsulated by semi-granular and granular haemocytes. The latter formed multiple layers across the resin, stretching themselves. Some had lost their nucleus or were apoptotic: such cellular lyses might drive the release of the granule content, especially the enzymes of the melanization cascade and the agglutination proteins like in other crustaceans [40,41]. Congruently, some melanization phenomena were detected.

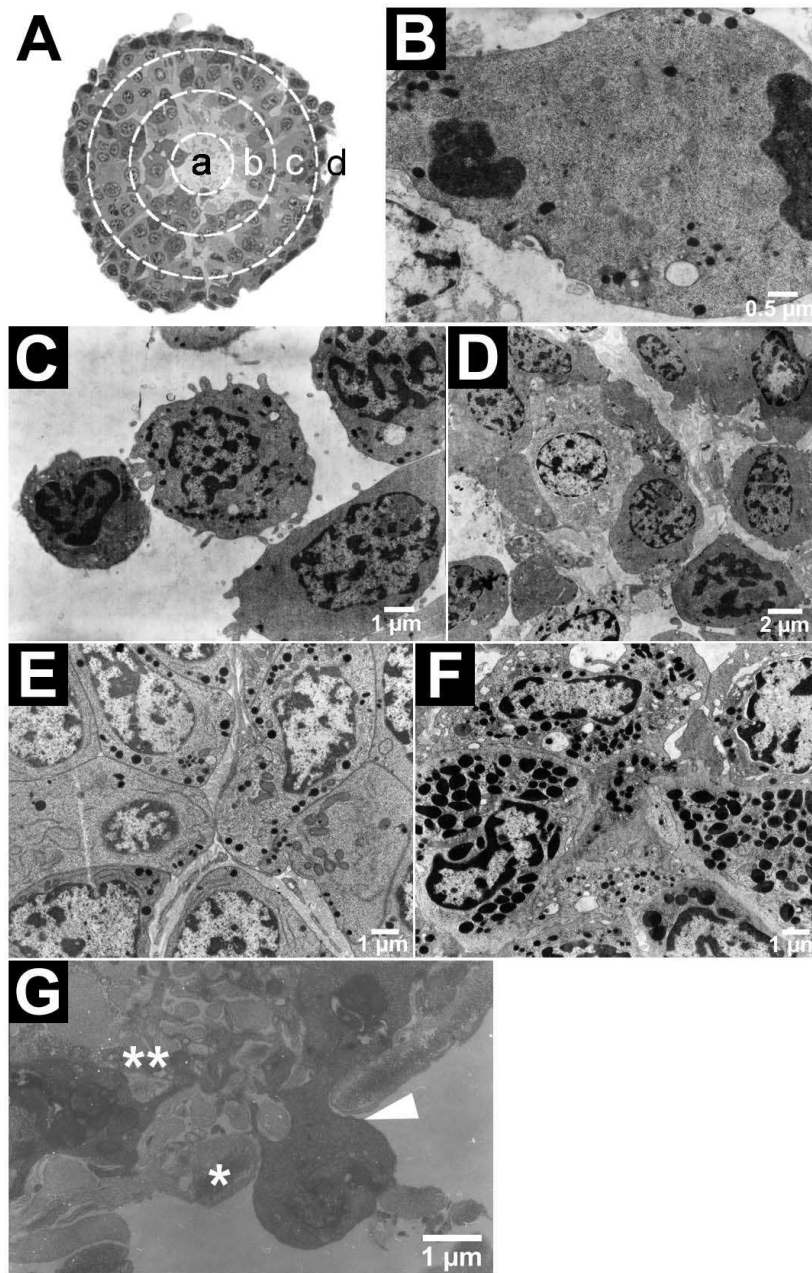


Figure 5. Layout of the haematopoietic organ (TEM). In the haematopoietic organ (A, transversal section and schematic layout), the compactness of the tissue and the morphology of the cells allowed discriminating between the central area (a, not visible here but see Fig. 7C), and the internal (b), central (c) and external (d) cortex. The central area contained stem cells (dividing, B) isolated and steeped in matrix (C, D). The granules appeared in the haemocytes from the central cortex on, though the granular types could not be distinguished (E). The external cortex contained mostly cells with granules (F). A diapedesis figure (arrowhead) across the basal membrane (*) indicated a probable route for haemocyte release from the external cortex (**) into the haemolymph (G).
doi:10.1371/journal.pone.0018531.g005

As in other invertebrates, crustacean haemocytes are produced in specialized tissues: the haematopoietic organs. Each lobule is surrounded by connective tissue and contains stem cells,

differentiating haemocytes, and mature blood cells. Haematopoietic organ location varies even between close taxa. In lobsters, crabs or freshwater crayfishes, the haematopoietic tissue is

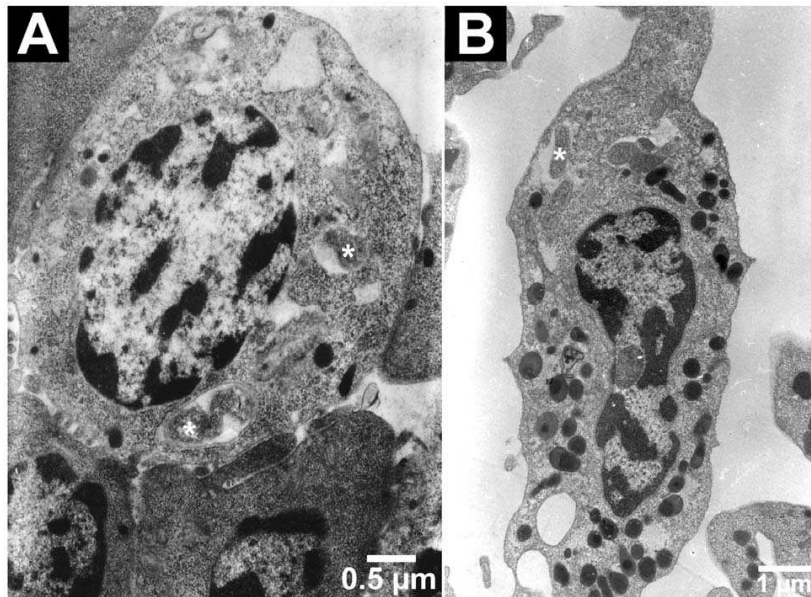


Figure 6. TEM detection of *Wolbachia* in haematopoietic organs and circulating haemocytes. *Wolbachia* (*) in a non-differentiated cell in an haematopoietic organ (A) and in a semi-granular haemocyte (B).
doi:10.1371/journal.pone.0018531.g006

composed of a series of ovoid lobules that collectively form a thin sheet on the dorsal surface of the foregut [8]. In the shrimp *Sicyonia ingetis*, the haematopoietic organs occur as a pair of nodules on the dorsolateral surface of the foregut [8]. The haematopoietic organs of *A. vulgare* were composed of three pairs of nodules, localized in the sixth and seventh abdominal segments and in the first telson segment against the pericardia septum as described previously in another isopod species (*Porcellio dilatatus*) [42]. Each nodule was wrapped in connective tissue which was limited by a basal membrane. Each contained haemocytes at different maturation stages, the least mature being in the central area. In crustaceans, it is still unknown whether granular and hyaline haemocytes stem from the same cells [36], and whether they follow a single line or two separate lines of differentiation. It is believed that maturation is complete when the haemocytes are released into the circulation [3], but the mechanisms behind this release are still unknown, as in most invertebrates. In *A. vulgare*, we observed diapedesis figures suggesting that haemocytes are released at least this way in this species.

... Meeting with their invaders, *Wolbachia*

When *Wolbachia* infect insect somatic tissues, they can be found in the haemolymph [43–46] though not always [47–49]. Their presence is revealed through PCR detection, or upon transfection experiments (the haemolymph proves infectious) [43–46]. They are believed to remain extracellular in the plasma [50], especially since Rasgon *et al.* [51] showed they can survive outside cells. *Wolbachia* are observed inside haemocytes only in the crustacean *A. vulgare* [28,30]. Their identification stands from their morphology (TEM) and from specific PCR assays (*wsp* gene, data not shown; type IV secretion system genes, [52]). They are enclosed in vacuoles, though TEM observations reveal no degradation patterns. Here we further confirmed they were alive by the FISH labelling of their 16S rRNA [53] using a *Wolbachia*-specific probe

[54]. Haemocyte colonization is not fortuitous insofar that it has been routinely observed over the years [28,30], plus we showed here that more than one third of the haemocytes was colonized.

The presence of live *Wolbachia* within haemocytes, the main actors of the immune system in crustaceans, can be surprising. Actually, *Wolbachia* are successfully transfected inside insect haemocyte-like cell lines, responding to bacterial challenge by immune responses such as phagocytosis or antimicrobial peptides synthesis [51,55]. But the stability of such transfections varies from a massive colonization to stabilization at 10% and even elimination [51,55]. It is suspected that the activation of some immune functions could limit *Wolbachia* invasion [55]. Here, in a host that inherited *Wolbachia* naturally through maternal transmission, haemocyte colonization was not massive (38% prevalence, six *Wolbachia* per cell on average). Notably so far TEM observations never revealed *Wolbachia* in hyaline haemocytes, suggesting that they could escape (lacking the appropriate surface receptors?) or resist infection (by destroying *Wolbachia*?). To investigate this, we need to develop fluorescent markers for each cell type, compatible with FISH. *Wolbachia* could ultimately serve as a marker of the granular and semi-granular cell lineages.

Regarding the origin of *Wolbachia* in haemocytes, it is doubtful that they were acquired from the plasma, since in our case they are not detected there by PCR (personal observation). Rather, the colonization would stand from the infection of the haematopoietic organs which was reported here for the first time. The *Wolbachia* were found in the stem cells as well as the differentiating cells until the very edge of the organs, suggesting that infected haemocytes can be released in the haemolymph. Not all the cells were infected: this could simply result from stochastic loss during mitosis. Uninfected cells also happened as clusters, although it was impossible to tell whether they radiated from an uninfected stem cell, be it hyaline ones or other. Since we could not enumerate the cells in the haematopoietic organs, we cannot link their

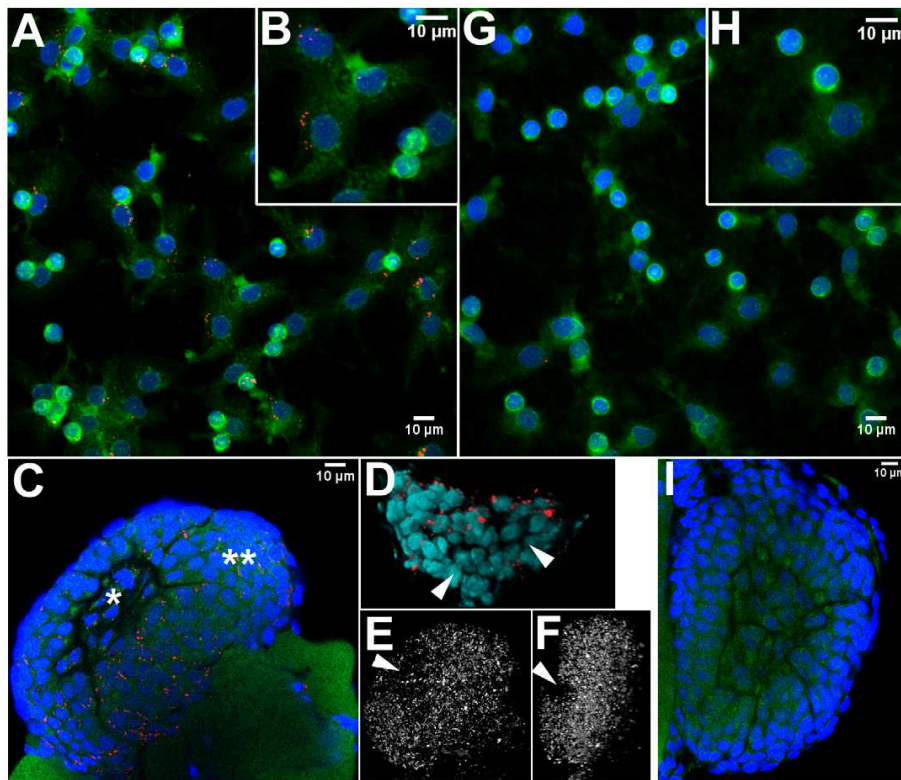


Figure 7. FISH detection of *Wolbachia* in circulating haemocytes and haematopoietic organs. In infected animals, *Wolbachia* (in red) colonized many haemocytes (A, B) and the central area (*) as well as the cortex (**) of the haematopoietic organ (C), although groups of cells remained uncolonized (Arrowheads, D–F). The control uninfected animals presented only rare *Wolbachia*-like artefacts (haemocytes, G–H, haematopoietic organ, I). A–C, G–H: red: *Wolbachia*, green: Actin; blue: Nuclei. A, B, G, H: average intensity Z-projections. B and H: Close-ups. D–F: 3D analysis (ImageJ 3D viewer) of image C. D: tilted volume rendering of *Wolbachia* (red) and the nuclei (turquoise) in the central area extracted from the Z-stack. E and F: volume rendering of *Wolbachia* (grey-scale) from the whole haematopoietic organ. E: front view corresponding to image C, F: tilted view (180°).

doi:10.1371/journal.pone.0018531.g007

colonization status with that of the haemocytes. Still the *Wolbachia* load was conserved across the central area and the cortex.

Wolbachia are detected in many somatic tissues in *A. vulgare*, but the colonization of the haematopoietic organs in particular may have further implications. Rigaud *et al.* [30] proposed the haemocytes to shuttle *Wolbachia* across the organism to infect or re-infect tissues. It makes sense insofar that transfection by short blood contact proved haemolymph to be infectious [56]. Also Rigaud *et al.* [30] found the colonized haemocytes in the vicinity of the oocytes during re-colonization after temperature curing. We propose that the haematopoietic organs act as a reservoir, similar to the Somatic Stem Cell Niche described by Frydman *et al.* [57] in *Drosophila*, although part of their argument is that cells there seldom divide and can therefore accumulate *Wolbachia*. Here, more than a reservoir it would be a factory where *Wolbachia* are packed safely inside cells, and delivered systematically in the haemolymph along with the haemocytes, throughout the life of the host, ensuring their location at the right place for horizontal transmission.

Animals investigated in this study were one-year-old and they had the same haemocyte density whether they were infected or not by *Wolbachia*. However, strikingly they exhibited different proportions in the haemocyte populations we were able to

separate. In infected animals, the percentage of hyaline and semi-granular haemocytes only very slightly increased, while granular haemocytes decreased by one third. In crustaceans, the PO cascade is stored in the granular haemocytes [8]: we have shown earlier that the PO activity is also reduced by one third in the very same animals [29]. In two-year-old infected animals the reduction in PO activity is even stronger, this time with a decrease in haemocyte densities [28,29]: with FACS, we will now confirm whether only granular haemocytes are affected. This would highlight that the presence of *Wolbachia* impairs an immune function through a cell type.

To sum up, we have characterized for the first time the immune cells of a terrestrial isopod, which turn out to resemble those of a shrimp. The potential diaporesis figures observed in the haematopoietic organs require further investigation, since it is the first clue for a mechanism of haemocyte release in crustaceans. In full opposition with what is known so far in insects, the endosymbionts *Wolbachia* colonized one third of the haemocytes as well as the haematopoietic organs. In infected animals the density of granular haemocytes decreased, which may account for the functional deficiencies we had observed. The question remains whether it presents any advantage for *Wolbachia*.

Methods

Ethics statement

All experimental procedures and animal manipulations did not require an ethics statement.

Animals

Armadillidium vulgare individuals infected by a feminizing *Wolbachia* strain (*wVulC*) [30,58] (originating from Helsingør, Denmark or Celles-sur-Belle, France) or uninfected (originating from Helsingør, Denmark or Nice, France [17,29]), were investigated. As *A. vulgare* males are never infected by *Wolbachia*, females only were used in this study. They were taken from laboratory lineages sampled 20 years ago from natural populations, reared at 20°C under natural photoperiod with food provided on an *ad libitum* basis. Flow cytometry experiments were realized on one-year old animals, the same age as in Sicard *et al.* [29].

Haemolymph and haematopoietic organs sampling

Cuticles were disinfected by immersing individuals for 30 s in a 10% sodium hydrochloride solution followed by a 30 s immersion in distilled water. The cuticle of animals was pierced dorsally between the sixth and the seventh dorsal abdominal segments using a needle and haemolymph was collected with a micropipette. The haematopoietic organs were dissected. As in the majority of terrestrial isopods, the three pairs are localized between the sixth and seventh abdominal segment and the first telson segment, along the dorsal vessel [42].

In vivo phagocytosis and encapsulation experiments

Phagocytosis phenomena were investigated by injecting China ink particles (Ø 30–40 nm; Pelikan, Günter Wagner) into animals. After washing in bidistilled water, the China ink particles were suspended in Ringer buffer (1.4 mM CaCl₂, 2.4 mM HNaCO₃, 2 mM KCl, 0.4 M NaCl). One microlitre was injected into the general cavity of *A. vulgare*. After two days, haemocytes were recovered from haemolymph and treated for Transmission electron microscopy (TEM) observations according to Braquart-Varnier *et al.* [28].

To investigate encapsulation phenomena, small resin cylinders (5 mm long) were introduced under the cuticle of animals. Eight days after implantation, the animals were dissected and the resin bits were fixed. For scanning electron microscopy, samples were treated as for TEM [28].

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Haemocytes and haematopoietic organs were sampled from five females. Two microlitres of haemolymph per individual were spotted on a polylysine coated slide (Kindler GmbH & Co., Germany) in a well (Ø~0.7 mm) drawn with a liquid repellent pen (Daido Sangyo Co. Ltd, Japan) and covered immediately with a 18×18 mm coverslip to prevent evaporation. The haemocytes were allowed to spread for 30 min at 4°C in a humid chamber. The slides were immersed for 5 min in a 1% paraformaldehyde-PBS solution (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 12H₂O, 1.5 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, pH 7.3). To discard the autofluorescent proteins of the haemolymph, the coverslips were shaken down immediately. The slides were washed in PBS for 5 min, dehydrated in 50, 80, 96% ethanol baths for 3 min each. The samples were hybridized according to Manz *et al.* [59] modified, in 20 µL of hybridization buffer per well, containing 35% formamide, Triton X-100 replacing SDS, 2 µL of an equimolar mixture of probes W1,2-Cy3 (30 ng.µL⁻¹) specifically targeting *Wolbachia* 16S

rRNA [54] and 0.2 µL FITC-phalloidin (Sigma, dried from methanol 100 µg.mL⁻¹ stock solution) targeting actin to show cell outlines. After washing and drying the samples, they were mounted in a mixture of DAPI (2.5 µg.mL⁻¹, Sigma) to label the nuclei and Citifluor (AF1 antifading, Citifluor, England). The haematopoietic organs were treated similarly, but due to their small size and because they did not attach to the slides, all the solutions were pipetted on the wells. They were fixed for 1 h in 20 µL of 3% paraformaldehyde-PBS, washed twice in PBS for 15 min and dehydrated.

Detection was performed with an Olympus confocal laser scanning microscope (Olympus IX81) and FV1000 2.0 software (Olympus) equipped with a 60× objective (PLAPO, water immersion, 1.2 NA), with Helium Neon (543 nm, to detect W1,2-Cy3), Argon (488 nm, for phalloidin) laser lines and a blue diode (405 nm, for DAPI). The images were recorded in sequential mode, with 0.5 µm steps between slices to scan the whole volume of the organ or cells. The voxel size was 0.265×0.265×0.5 µm³.

The analyses were performed with Image J 1.42q [60]. The number of haemocytes and their *Wolbachia* colonization status were recorded in five random images (212×212 µm²) per female. Haemocytes touching the image borders, i.e. incomplete ones, were ignored. The *Wolbachia* titers in cells were estimated in 144 haemocytes (eight photos from three animals) and one haematopoietic organ of each of the five females. The volume of *Wolbachia* fluorescence was measured semi-automatically by selecting the bacteria within a Region Of Interest (ROI), thresholding automatically each image in the stack and applying the “Voxel counter” plugin. Five non-clustering *Wolbachia* were chosen in each photo (*n* = 40) to estimate the mean volume of one bacterium. The volumes measured can subsequently be converted to equivalent *Wolbachia* numbers. To infer the amount of artefacts, the same analyses were run on uninfected animals: the proportion of haemocytes containing signals resembling *Wolbachia* and the corresponding autofluorescent voxels were enumerated (27 haemocytes, 15 photos from three animals). Images from infected and uninfected animals were treated with the same parameters from the acquisition on.

Separation of haemocyte populations

Continuous gradients of 9 mL of 55% Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in Ringer isopod solution (1.4 mM CaCl₂, 2.4 mM NaHCO₃, 2 mM KCl, 0.4 M NaCl) adjusted to 0.194 M NaCl were performed (28 000×g, 30 min, 4°C). To minimize cell attachment to the centrifuge tube wall, all tubes were washed in 6 M urea, pH 2 and rinsed thoroughly in distilled water before use [34].

The haemolymph from 30 animals was collected on ice and half diluted in an anticoagulant buffer (MAS: 9 mM EDTA; 115 mM glucose; 336 mM NaCl; 27 mM sodium citrate, pH 7 [61]). Six hundred microlitres of this haemolymphatic solution were added on the top of the Percoll gradient and centrifuged (400×g, 20 min, 15°C). Cell bands were collected individually and one volume of Ringer isopod solution was added to break the gradient. The haemocytes were pelleted (200×g, 15 min, 4°C) and resuspended in the appropriate solution either for TEM or for flow cytometry analyses.

Flow cytometry

The haemocytes were suspended in MAS buffer, enumerated with an automated Cell Counter (Invitrogen Countess™) and the cell titer was adjusted to 10⁵ haemocytes per 500 µL.

Flow cytometry was performed with a FACS Canto II (BD Biosciences) equipped with Argon (488 nm) laser. Dead cells were

labelled with propidium iodide (final concentration 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) to exclude them. Two cytogram parameters based on forward scatter height (FSC) and side scatter height (SSC) of unlabelled viable cells were designed. For each haemocyte sample, 50 000 events were counted. The results were expressed as a dot plot indicating the cell size (FSC value) and the internal cell complexity (SSC value). Diva 6.0 software (BD Biosciences) was used to create logical regions.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using JMP v2.5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Percentage estimates were arcsine-square-root transformed to meet homogeneity of variances and normality. Measures of the volume of fluorescence were analysed after Box–Cox transformation [62]. The FSC and SSC values were checked for normal distribution (Shapiro–Wilk's test) and homoscedasticity (Bartlett's test). When the data fitted the

normal distribution, a *t* test was performed. Otherwise Wilcoxon's test was used. The numbers of events were compared with Pearson's tests.

Acknowledgments

We thank Mathieu Sicard and Richard Cordaux for their critical and constructive discussions, the electronic microscopy center of the University of Poitiers (SIMIS) and Gilbert Martin who had initiated this project.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FC JH-G JB FM PG CB-V. Performed the experiments: FC JH-G JB MR CB-V. Analyzed the data: FC JH-G JB MR FM DB PG CB-V. Contributed reagents/materials/analysis tools: FC JH-G JB MR FM. Wrote the paper: FC JB DB PG CB-V.

References

- Broderick NA, Welchman DP, Lemaître B (2009) Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In: Rolff J, Reynolds SE, eds. Insect, infection and immunity: evolution, ecology and mechanisms. New York: Oxford University Press. pp 13–33.
- Iwanaga S, Lee BL (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 38: 128–150.
- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K (2006) Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213–236.
- Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS (2004) Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol* 25: 289–294.
- Zaslöf M (2002) Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet* 360: 1116–1117.
- Cerenius L, Söderhäll K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198: 116–126.
- Bauchau AG (1981) Crustaceans. In: Ratcliffe NA, Rowley AF, eds. Invertebrate blood cells. London: Academic Press. pp 385–420.
- Johansson MW, Keyser P, Sritunyaluksana K, Söderhäll K (2000) Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45–52.
- Herbinière J, Braquart-Varnier C, Grève P, Strub J, Frère J, et al. (2005) Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (terrestrial isopod, crustacean). *Dev Comp Immunol* 29: 489–499.
- Herbinière J, Grève P, Strub J, Thiersé D, Raimond M, et al. (2008) Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*. *Dev Comp Immunol* 32: 875–882.
- Jaenicke E, Fraune S, May S, Irmak P, Augustin R, et al. (2009) Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? *Dev Comp Immunol* 33: 1055–1063.
- Roth O, Kurtz J (2009) Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (crustacea: isopoda). *Dev Comp Immunol* 33: 1151–1155.
- Bouchon D, Cordaux R, Grève P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: Bourtzis K, Miller TA, eds. Insect symbiosis. Boca Raton FL: Taylor & Francis Group. pp 273–294.
- Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Hotopp JCD, Sapountzis P, Lo N, et al. (2009) Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Mol Biol Evol* 26: 231–241.
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc Biol Sci* 265: 2407–2413.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281: 215–220.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P (1998) Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc Biol Sci* 265: 1081–1090.
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Bouchon D (2001) *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol* 14: 237–243.
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16: 1711–1723.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci* 261: 55–63.
- Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR, Harris HL (2008) The endosymbiont *Wolbachia pipiensis* induces the expression of host antioxidant proteins in an *Aedes albopictus* cell line. *PLoS ONE* 3: e2083.
- Glaser RL, Meola MA (2010) The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile Virus infection. *PLoS ONE* 5: e11977.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322: 702.
- Moreira LA, Iturbe-Omaeche I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, et al. (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139: 1268–1278.
- Osborne SE, Leong YS, O'Neill SL, Johnson KN (2009) Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathog* 5: e1000656.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6: e2.
- Fytro A, Schofield PG, Kraaijeveld AR, Hubbard SF (2006) *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proc Biol Sci* 273: 791–796.
- Braquart-Varnier C, Lachat M, Herbinière J, Johnson M, Caubet Y, et al. (2008) *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *PLoS ONE* 3: e3286.
- Sicard M, Chevalier F, De Vlehouwer M, Bouchon D, Grève P, et al. (2010) Variations of immune parameters in terrestrial isopods: a matter of gender, aging and *Wolbachia*. *Naturwissenschaften* 97: 819–826.
- Rigaud T, Souty Grosset C, Raimond R, Mocquard J, Juchault P (1991) Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (isopoda) - recent acquisitions. *Endocytobiosis and Cell Res* 7: 259–273.
- Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, Nonaka M, Söderhäll K (2010) Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci* 35: 575–583.
- Vázquez L, Pérez A, Millán D, Agundis C, Martín G, et al. (1997) Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Morphol* 234: 147–153.
- Gargioni R, Barracco MA (1998) Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *J Morphol* 236: 209–221.
- Söderhäll K, Smith VJ (1983) Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol* 7: 229–239.
- Matozzo V, Marin MG (2010) The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: a first survey. *Fish Shellfish Immunol* 28: 534–541.
- Söderhäll I, Söderhäll K (2001) Biology of freshwater crayfish. London: Blackwell Science. pp 439.
- Hose JE, Martin GG, Gerard AS (1990) A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol Bull* 178: 33–45.
- Sung HH, Sun R (2002) Use of monoclonal antibodies to classify hemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Crustacean Biology* 22: 337–344.
- Giulianini PG, Bierti M, Lorenzon S, Battistella S, Ferrero EA (2007) Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron* 38: 49–57.
- Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodriguez J, Bulet P, et al. (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci* 113(Pt 3): 461–469.

41. Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, Agundis C, Pereyra-Morales A, et al. (2009) Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immun* 15: 179–188.
42. Coutant M (1977) Contribution à l'étude cytologique et fonctionnelle des hémocytes et des organes hématopoïétiques chez l'oniscoïde *Porcellio dilatatus*, Brandt. Dissertation, Université de Poitiers.
43. Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, et al. (1999) *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 153–160.
44. Kang L, Ma X, Cai L, Liao S, Sun L, et al. (2003) Superinfection of *Laodelphax striatellus* with *Wolbachia* from *Drosophila simulans*. *Heredity* 90: 71–76.
45. Montlor CC, Brodie EL, Lechner MG, Purcell AH (2007) Exploration for facultative endosymbionts of glass-winged sharpshooter (Hemiptera:Cicadellidae). *Ann Entomol Soc Am* 100: 345–349.
46. Kageyama D, Narita S, Noda H (2008) Transfection of feminizing *Wolbachia* endosymbionts of the butterfly, *Eurema hecabe*, into the cell culture and various immature stages of the silkworm, *Bombyx mori*. *Microb Ecol* 56: 733–741.
47. Kamoda S, Masui S, Ishikawa H, Sasaki T (2000) *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in the cricket *Teleogryllus taivanemna*. *J Exp Biol* 203: 2503–2509.
48. Gómez-Valero L, Soriano-Navarro M, Pérez-Brocal V, Heddi A, Moya A, et al. (2004) Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *J Bacteriol* 186: 6626–6633.
49. Goto S, Anbutsu H, Fukatsu T (2006) Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. *Appl Environ Microbiol* 72: 4805–4810.
50. Brownlie JC, Adamski M, Slatko B, McGraw EA (2007) Diversifying selection and host adaptation in two endosymbiont genomes. *BMC Evol Biol* 7: 68.
51. Rasgon JL, Gamston CE, Ren X (2006) Survival of *Wolbachia pipiensis* in cell-free medium. *Appl Environ Microbiol* 72: 6934–6937.
52. Félix C, Pichon S, Braquart-Varnier C, Braig H, Chen L, et al. (2008) Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for type IV secretion machinery in *Wolbachia* of *Armadillidium vulgare*. *Res Microbiol* 159: 481–485.
53. Christensen H, Hansen M, Sorensen J (1999) Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 65: 1753–1761.
54. Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H, Nardon P (1999) Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6814–6819.
55. Xi Z, Gavotte L, Xie Y, Dobson SL (2008) Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host. *BMC Genomics* 9: 1.
56. Rigaud T, Juchault P (1995) Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J Evol Biol* 8: 249–255.
57. Frydman HM, Li JM, Robson DN, Wieschaus E (2006) Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature* 441: 509–512.
58. Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity* 93: 78–84.
59. Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142: 1097–1106.
60. Rasband WS ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
61. Rodriguez J, Boulo V, Mialhe E, Bachere E (1995) Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J Cell Sci* 108: 1043–1050.
62. Box GEP, Cox DR (1964) An analysis of transformations. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 26: 211–252.

Variations of immune parameters in terrestrial isopods: a matter of gender, aging and *Wolbachia*

Mathieu Sicard · Frédéric Chevalier ·
Mickaël De Vlechouwer · Didier Bouchon ·
Pierre Grève · Christine Braquart-Varnier

Received: 25 May 2010 / Revised: 9 July 2010 / Accepted: 9 July 2010 / Published online: 30 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Ecological factors modulate animal immunocompetence and potentially shape the evolution of their immune systems. Not only environmental parameters impact on immunocompetence: Aging is one major cause of variability of immunocompetence between individuals, and sex-specific levels of immunocompetence have also been frequently described. Moreover, a growing core of data put in light that vertically transmitted symbionts can dramatically modulate the immunocompetence of their hosts. In this study, we addressed the influence of gender, age and the feminising endosymbiont *Wolbachia* (wVulC) on variations in haemocyte density, total PO activity and bacterial load in the haemolymph of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. This host–symbiont system is of particular interest to address this question since: (1) wVulC was previously shown as immunosuppressive in middle-aged females and (2) wVulC influences sex determination. We show that age, gender and *Wolbachia* modulate together immune parameters in *A. vulgare*. However, wVulC, which interacts with aging, appears to be the prominent factor interfering with both PO activity and haemocyte density. This interference with immune parameters is not the only aspect of wVulC virulence on its host, as reproduction and survival are also altered.

Keywords Isopod crustacean · *Wolbachia* · Aging · Gender · Phenoloxidase · Haemocyte · Immunocompetence

M. Sicard (✉) · F. Chevalier · M. De Vlechouwer · D. Bouchon ·
P. Grève · C. Braquart-Varnier
Laboratoire Ecologie, Evolution, Symbiose, UMR CNRS 6556,
Université de Poitiers,
40 avenue du recteur Pineau,
86022 Poitiers cedex, France
e-mail: mathieu.sicard@univ-poitiers.fr

C. Braquart-Varnier
e-mail: christine.braquart@univ-poitiers.fr

Introduction

Fitness of organisms is highly dependent on the capacity of their immune systems to provide them with efficient protection against pathogens and parasites. This global ability to survive infections, defined as ‘immunocompetence’, is deeply influenced by ecological factors, including intraspecific constraints (i.e. life history trade-offs, sexual conflicts) and biotic or abiotic interactions (Schulenburg et al. 2009). Changes in these ecological factors can trigger variation in immunocompetence between individuals through non-adaptive physiological perturbations and/or via adaptation. In the latter case, ecological factors act as selective forces that shape immune system evolution (Schulenburg et al. 2009). Thus, sex-dependent selective processes can lead to genders differing in immunocompetence. In vertebrates, females are typically more immunocompetent than males since testosterone, the male hormone, is mainly immunosuppressive (Roberts et al. 2004). The few studies that addressed this question in invertebrates also showed a higher immunocompetence in females (Radhika et al. 1998; Kurtz et al. 2000; Rolff 2001; Rigaud and Moret 2003). An important number of reports indicates that senescence is also strongly interplaying with immunocompetence. In humans, the adaptive immune system exhibits a diminished response during aging, while the innate immune system increases, possibly inducing chronic inflammation (DeVeale et al. 2004). Aged *Drosophila* exhibit a drastic up-regulation of innate immunity-related genes but reduced survival when facing pathogens (Ramsden et al. 2008).

Vertically transmitted symbionts, by living inside their hosts during their whole life, potentially interplay with all life history traits of their host, including immunocompe-

tence. Thus, the ability of one host to fight new invaders not only relies on host immune effectors but on the global response of the host and its resident symbionts (i.e. extended phenotype). Recently, it has been shown that two vertically transmitted endosymbionts of pea aphids (*Serratia symbiotica* and *Hamiltonella defensa*) are major components of their host resistance towards parasitoids (Oliver et al. 2005; Scarborough et al. 2005; Oliver et al. 2008, 2009). Similarly, *Wolbachia*, which are the most widespread vertically transmitted endosymbionts in arthropods, have also been found to mediate their host immunocompetence in several ways (Fytrou et al. 2006; Gross et al. 2009; Saridaki and Bourtzis 2009). These symbionts provide *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti* with protection towards different viruses, including dengue and chikungunya, but also against the protozoan *Plasmodium* (Hedges et al. 2008; Teixeira et al. 2008; Moreira et al. 2009; Osborne et al. 2009). However, in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*, Braquart-Varnier et al. (2008) demonstrated that middle-aged individuals (i.e. 2 years old) infected with *wVul* are immunodepressed since they exhibited a decrease in haemocyte density and an increase in cultivable bacteria in the haemolymph, but also extra mortality (Braquart-Varnier et al. 2008). Whatever direction it takes, this growing core of data clearly emphasises a strong interaction between symbionts and host immune system, potentially explaining part of intra-specific variation in immunocompetence.

To assess such variation in a wide range of individuals with different genders, age and infection status, immune parameters have to be carefully chosen. For arthropods, the immune system relies only on innate immune effectors. These effectors are either cellular, leading to phagocytosis, nodulation and encapsulation, or humoral, including destruction of microbes by antimicrobial peptides and melanisation through the prophenoloxidase (proPO) cascade. The role of PO is still highly debated because not all the results obtained show the same trend (Leclerc et al. 2006; Cerenius et al. 2008). Still, in crustaceans, the proPO cascade has clearly been shown to protect against pathogens, especially bacterial ones (Liu et al. 2007; Fagutao et al. 2009; Cerenius et al. 2010). In paradox, the haemolymph of apparently healthy crustaceans is not always sterile (Sizemore et al. 1975; Braquart-Varnier et al. 2008; Fagutao et al. 2009). In shrimps deprived of proPO by RNAi silencing, septicaemia and mortality increased, while haemocyte density decreased, suggesting that proPO plays a role not only in protecting against intruding pathogens but also in maintaining general homeostasis (Fagutao et al. 2009). By taking all these elements into account, it seems that, in crustaceans, haemocyte density, PO activity and bacterial load in the haemolymph are accurate immune parameters to compare

groups of individuals undergoing variation in ecological factors.

Here, we address the question of the impact of gender, age and the endosymbiont *Wolbachia* (*wVulC*) on variation of haemocyte density, total PO activity and bacterial load in the haemolymph of the terrestrial isopod *A. vulgare*. This host–symbiont system is of particular interest to address this question for three main reasons. First, the studied symbiotic bacterium *wVulC* is a feminising strain: This means that populations of *A. vulgare* infected by this symbiont are not only composed of normal males and females but also by genotypic males that exhibit a female phenotype due to the action of *Wolbachia*. Thus, infected females can be indistinguishably either genetic females or feminised males. This is a unique situation to study the impact of gender and *Wolbachia* on immune parameters. Second, this is the only model system where *Wolbachia* have been frequently spotted in immune cells, suggesting an important interaction between *Wolbachia* and immune cell functions (Rigaud et al. 1991; Braquart-Varnier et al. 2008). Third, among the hosts of *Wolbachia*, *A. vulgare* shows a long lifespan, as it survives up to 3 years: As an interference between *Wolbachia* and aging has been previously suggested (Evans et al. 2009), we also address the question of the impact of *Wolbachia* on aging of the immune system.

Materials and methods

Armadillidium vulgare lineages with and without *wVulC*

Armadillidium vulgare lineages used in this study were founded by individuals originally sampled in a population of Helsingör (Denmark) 20 years ago. This original sampling contained males and two distinguishable types of females: females infected by *Wolbachia* (*wVulC*) (w^+ females) and uninfected ones (w^- females). Ovaries coming from some w^+ females have been sampled and implanted in five w^- females in order to obtain w^+ females with the very same genetic background as w^- females. These five newly infected w^+ females and five w^- females were then crossed with related males to start two separate lineages with similar genetic background infected or not by *wVulC* (Fig. 1).

Effect of *wVulC* on *A. vulgare*'s offspring

w^- and w^+ lineages were maintained by 10 independent crossings of 9-month-old individuals once a year (Fig. 1). Progenies were separated by phenotypic gender and counted when sexually differentiated (3 months old) (Fig. 1). This counting led to assess virulence of *wVulC*

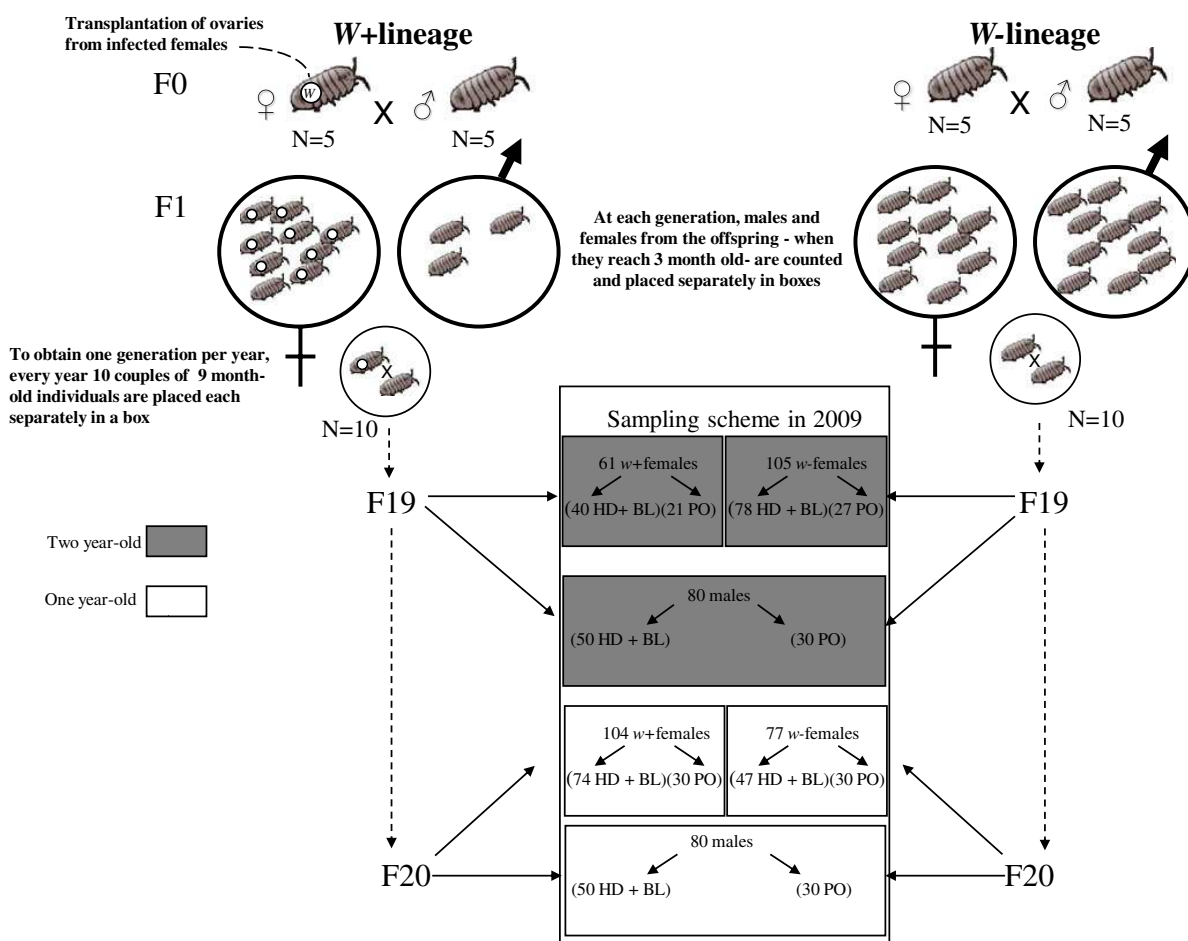


Fig. 1 Description of the crossing scheme, time course of the measurements and sample sizes for each condition and experiment. *HD* haemocyte density, *BL* bacterial load

by two parameters: (1) intensity of feminisation (measurement of bias in sex ratio) and (2) impact on reproduction rate by measuring the first brood size. Virgin females and males were then grown separately at 20°C on moistened potting mix derived from peat from sphagnum moss (pH=6.4 and conductivity=50.0 mS/m) with dead leaves and carrot slices as a food source until use for experiments. If not killed for experiments, individuals maintained in such laboratory conditions survive on average of 3 years.

Infection status

To check for presence/absence of *Wolbachia*, all individuals used in experiments were dissected and total DNA was extracted from the ovary as previously described (Kocher et al. 1989), and PCR amplifications were then performed using specific primer sets for the *wsp* gene and conditions as previously described (Cordaux et al. 2004).

Haemolymph sampling

For all measurements, haemolymph was sampled in the same way: Cuticles were disinfected by immersing individuals for 30-s in a 10% sodium hypochlorite solution followed by a 30-s immersion in distilled water. The cuticle was then pierced dorsally between the sixth and seventh abdominal segments using a fine needle, and up to 10 µl haemolymph was collected with a micropipette.

Natural bacterial load assessment

The haemolymph (10 µl) of each individual was individually sampled and added to 90 µl of LB medium. This suspension was then plated onto one plate of chocolate medium (Biomérieux), on which most bacteria, even fastidious ones, can grow. After 3 days at 28°C, the total number of colony-forming units (CFUs) was determined

without taking into account the difference in colony phenotypes.

Haemocyte density

The haemolymph (10 μL) of each individual was individually sampled and added to 57 μL of MAS [27 mM sodium citrate: 336 mM NaCl, 115 mM glucose, 9 mM EDTA, pH 7 (Herbiniere et al. 2005)] and 33 μL of 0.4% Trypan blue to discriminate dead haemocytes from living ones. The actual number of living haemocytes per millilitre (i.e. haemocyte density) in each sample was evaluated using an automated Cell Counter (Invitrogen Countess™).

PO activity assessment

Each measurement of total PO activity was conducted in 96-well plates on a pool of haemolymph coming from three individuals of the same status. The first haemolymph sample (9 μL =3 μL ×3 individuals) was deposited in the first well containing 40 μL of cacodylate buffer [10 mM sodium cacodylate (Sigma) and 10 mM calcium chloride], while the second sample of haemolymph (9 μL =3 μL ×3 from the same individuals) was added to the second well containing 40 μL of cacodylate buffer supplemented with phenylthiourea (1 mg mL⁻¹ of phenylthiourea in cacodylate buffer; Acros Organics), which is known to specifically inhibit PO activity. Then, 40 μL of Trypsin (1 mg mL⁻¹ in sterile deionised water; Fisher Scientific) was added to each well in order to mimic bacterial intrusion by usually triggering the cleavage of proPO into PO, which activates the proPO cascade and leads to melanisation. Using trypsin thus leads to dose the total potential PO activity stocked by the animal. The plate containing samples was then incubated for 45 min at 37°C. After this first incubation, 120 μL of L-DOPA (4 mg mL⁻¹ prepared extemporaneously in cacodylate buffer; Acros Organics) was added in each well immediately before placing the plate in a spectrophotometer for 4 h at 37°C. Oxidised substrate quantity was then evaluated by optical density (OD) at 492 nm. The OD was measured for 4 h because a pilot study showed that the activity was quite low in our model system and that this time was needed to reach the middle of exponential enzymatic activity (data not shown).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using JMP software (JMP, 2001, version 4.03; SAS Institute, Cary, NC, USA). As they showed non-normal distribution (Shapiro–Wilk test $p < 0.05$; Levene test $p < 0.05$ even after classical transformations), data on (1) sex ratio and (2) proportion of individuals with bacteria in the haemolymph were analysed by multiple

logistic regressions, Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests. Brood size, haemocyte density and PO activity data showed normal distribution after Box–Cox transformation (Box and Cox 1964) (Shapiro–Wilk test $p > 0.05$) and homoscedasticity of variances (Levene test $p > 0.05$). Brood sizes between w^+ and w^- females were compared using a t test. The impact of ecological parameters (gender, age and *Wolbachia*) on haemocyte density and total PO activity and interactions between ecological parameters were then tested by ANOVA followed by PLSD Fisher post-hoc test. Box–Cox transformed data are presented in the graphs, while non-transformed data are presented in the text. As we cannot distinguish true infected females from feminised males, we based our comparison on phenotypic gender: Only female phenotypes are infected by *Wolbachia*; as such, its effect and interactions with other parameters were only tested for females.

Results

Reduction of brood size by the *wVulC* feminising strain

Crossings results collected during 10 years (F10 to F20) for the two lineages (i.e. infected or not by *Wolbachia*) are presented in Fig. 2a, b. It clearly confirms in this Danish lineage that *wVulC* significantly biases progeny towards phenotypic females (Fig. 2a; mean proportion of females = 0.508 ± 0.007 for w^- lineage vs 0.71 ± 0.04 for w^+ lineage; MW: $z = -5.36$, $p < 0.0001$). Figure 2a shows that the distribution of sex ratios is wider for the w^+ lineage than for the w^- one. In the w^+ lineage, there were more broods containing almost only males (i.e. sex-ratio biased towards males): When *Wolbachia* is not transmitted, the genetic sex of the offspring is mainly male (i.e. ZZ). This can be interpreted as the fact that the w^+ lineage would contain more Z sexual chromosomes than the w^- lineage. The number of progenies in the brood was significantly different between lineages (Fig. 2b): Crossings in the w^+ lineage gave significantly less progenies than in the w^- one (57 ± 4 individuals per brood for w^+ vs 74 ± 4 individuals for w^- ; t test $t = 3.4061$, $df = 1$, $p < 0.0001$), showing a cost of *wVulC* on *A. vulgare* female's fitness.

Variation in natural bacterial load

Data obtained for natural bacterial load contained two types of information: (1) the proportion of individuals that exhibited bacteria in their haemolymph (i.e. septicaemia) and (2) the intensity of this septicaemia measured as the total number of CFU units per microlitre of haemolymph. The proportion of septic individuals was comprised between 24% and 39% for females and 12.5% and 22.5% for males. Analysis by multiple regression analyses showed that neither *Wolbachia* nor age could explain the proportion of septic individuals. The

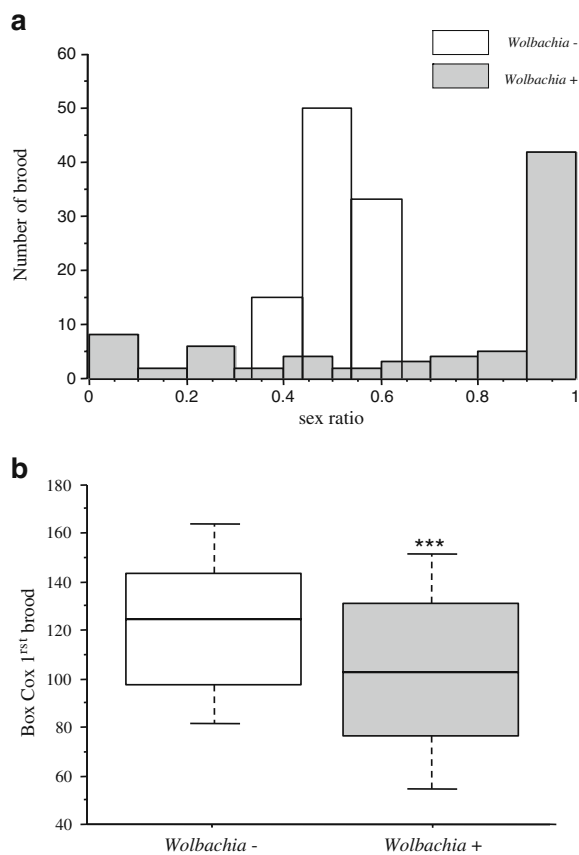


Fig. 2 Reproduction of *A. vulgare* in w^+ and w^- lineages. **a** Distribution of the sex ratios for both lineages. **b** Box plot of the brood sizes for both lineages. Brood size data were transformed by a Box–Cox procedure

intensity of septicaemia was individually highly variable (ranging from 1 to 700 bacteria per microlitre) and not normally distributed even after classical transformations. The non-parametric Kruskal–Wallis test revealed no significant difference between conditions.

Variation in immune parameters: PO activity and haemocyte density

Immune parameters measured (i.e. PO activity and haemocyte density) were significantly influenced by gender, age or *Wolbachia* (see Table 1).

PO activity in *A. vulgare*

Even if a proPO cascade is considered ubiquitous in most insects and crustaceans (Cerenius et al. 2008), in isopods including *A. vulgare*, it is not clear if conversion of L-DOPA into L-dopachrome characterising PO activity is due

Table 1 Multiple analysis of variances for the effect of gender, age and *Wolbachia* on immune parameters

	Immune parameters	ddl	<i>F</i>	<i>p</i>
Gender	Haemocyte density	1	88.057	<0.001
	PO activity	1	22.493	<0.001
Age	Haemocyte density	1	14.406	<0.001
	PO activity	1	6.916	0.011
<i>Wolbachia</i>	Haemocyte density	1	0.012	0.914
	PO activity	1	29.557	<0.001
<i>Wolbachia</i> × age	Haemocyte density	1	9.224	0.003
	PO activity	1	2.901	0.093
Gender × age	Haemocyte density	1	1.608	0.206
	PO activity	1	0.796	0.378

to the action of the typical phenoloxidase enzyme or achieved by other proteins such as haemocyanin (Jaenicke et al. 2009). In *A. vulgare*, some serine proteases possibly involved in the proPO cascade have been detected by 2-D electrophoresis but no proper proPO or PO (Herbiniere et al. 2008). However, in this study, we were able to quantify a phenoloxidase activity highly activated by Trypsin (data not shown) leading to melanisation. Moreover, comparisons of OD_{492 nm} obtained between all samples with or without phenylthiourea (PTU) shows that this molecule strongly inhibits conversion of L-DOPA into L-dopachrome (mean OD_{492 nm} after 4 h with PTU: 0.66 ± 0.02 vs mean OD_{492 nm} after 4 h without PTU: 2 ± 0.7 ; MW: $z = -9.043$, $p < 0.0001$). This demonstrates that we measured a PO activity specifically inhibited by PTU.

Effect of gender

Haemocyte densities in the w^- lineage were higher in males than in females (Fig. 3a; 1-year-old animals: males $40.94 \times 10^6 \pm 2.02 \times 10^6$ vs females $25.33 \times 10^6 \pm 1.76 \times 10^6$, $p < 0.001$; 2-year-old animals: males $38.08 \times 10^6 \pm 1.995 \times 10^6$ vs females $20.77 \times 10^6 \pm 1.17 \times 10^6$, $p < 0.001$), while PO activities were on the opposite lower in males (Fig. 3b; 1-year-old animals: males 1.936 ± 0.141 vs females 2.798 ± 0.294 , $p = 0.005$; 2-year-old animals: males 1.497 ± 0.145 vs females 2.403 ± 0.0790 , $p < 0.001$).

Effect of aging

During aging, both haemocyte densities and PO activities tend to decrease (Fig. 3a, b). This decrease was significant for haemocyte density in both distinguishable types of females (i.e. w^+ and w^- females) (w^- females: 1 year old $25.33 \times 10^6 \pm 1.76 \times 10^6$ vs 2 years old $20.77 \times 10^6 \pm 1.17 \times 10^6$, $p = 0.039$; w^+ females: 1 year old $28.12 \pm 1.79 \times 10^6$ vs

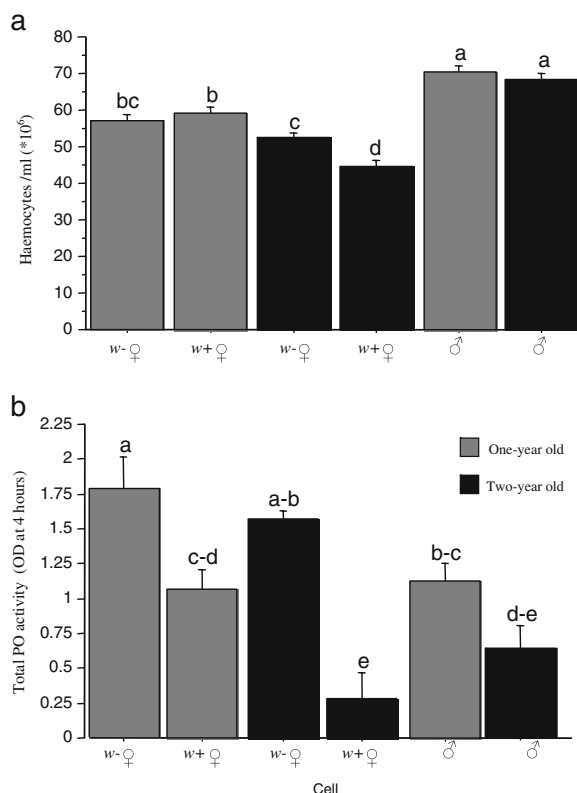


Fig. 3 Variation on immune parameters due to gender, aging and wVulC. Haemocyte density (a) and PO activity (b) for 1-year-old and 2-year-old females infected or not by *Wolbachia* and for 1-year-old and 2-year-old males. Immune data were transformed by a Box–Cox procedure. Levels not connected by same letter are significantly different. Error bars represent $\pm$ SE

2 years old $14,474 \pm 1,453$, $p < 0.001$), but not for males (1-year-old males $40.94 \times 10^6 \pm 2.02 \times 10^6$ vs 2-year-old males $38.08 \times 10^6 \pm 1.99 \times 10^6$, $p = 0.398$). Both males and w⁺ females exhibited a significant decrease in PO activity with aging (1-year-old males 1.936 ± 0.141 vs 2-year-old males 1.497 ± 0.145 , $p = 0.033$; 1-year-old w⁺ females 1.880 ± 0.144 vs 2-year-old w⁺ females 1.218 ± 0.134 , $p = 0.004$), but no significant decrease for w⁻ females was detected (1-year-old w⁻ females 2.798 ± 0.294 vs 2-year-old w⁻ females 2.403 ± 0.079 , $p = 0.360$).

Effect of wVulC

Haemocyte densities were reduced by *Wolbachia* in 2-year-old females but not in 1-year-old ones (1-year-old w⁻ females $25.33 \times 10^6 \pm 1.76 \times 10^6$ vs 1-year-old w⁻ females $28,120 \pm 1,794$, $p = 0.344$; 2-year-old w⁻ females $20.77 \times 10^6 \pm 1.17 \times 10^6$ vs 2-year-old w⁺ females $14.47 \times 10^6 \pm 1.45 \times 10^6$, $p < 0.001$) (Fig. 3a). PO activities are strongly reduced by wVulC in both 1-year-old and 2-year-old females (1-year-old

w⁻ females 2.798 ± 0.294 vs 1-year-old w⁺ females 1.880 ± 0.144 , $p = 0.002$; 2-year-old w⁻ females 2.403 ± 0.079 vs 2-year-old w⁺ females 1.218 ± 0.134 , $p < 0.001$) (Fig. 3b).

Interaction between ecological factors

No interaction was revealed between gender and age: Both genders underwent the same changes in immune parameters during aging (see Table 1). A significant interaction between *Wolbachia* and aging was detected on females' haemocyte densities: Haemocyte density was more affected by aging in w⁺ females than in w⁻ ones (see Table 1).

Discussion

Many vertebrate species show gender-specific variation in parasitism, with prevalence and overall parasite burdens being higher in males (May 2007). In invertebrates, the few studies that addressed this question also showed a higher immunocompetence in females (Radhika et al. 1998; Kurtz et al. 2000; Rolff 2001; Rigaud and Moret 2003). An explanation for this variation in immunocompetence between genders is that females invest more in immunity in order to maximise lifespan, whereas males invest less in immunity in order to allocate more to mating (May 2007). In our model system, three types of individuals can be easily distinguished: males (which are not infected by *Wolbachia*), *Wolbachia*-negative females and *Wolbachia*-positive females. However, within *Wolbachia*-positive females, there are two indistinguishable types: true females and feminised males. Thus, variation of immune parameters due to gender can be clearly analysed only between *Wolbachia*-negative females and males. Our data show that both sexes do not develop the same components of immunity: While females have stronger PO activities as previously described in other invertebrates (Radhika et al. 1998; Kurtz and Sauer 2001; Rolff 2001; Rigaud and Moret 2003), males seem to invest more into haemocyte production. Aging did not affect the measured immune parameters differently between genders. It thus seems that, to reproduce for several years, both genders have to invest similarly in immunity to survive pathogen infections.

The *Wolbachia* strain infecting our lineages (wVulC) has been previously shown to feminise *A. vulgare* by transforming genetic males into functional females during development (Martin et al. 1973; Juchault et al. 1974; Rigaud et al. 1991; Cordaux et al. 2004; Bouchon et al. 2008). Our crossings data support this demonstration in the Danish lineage used in this study, with infected females producing progeny that are generally strongly biased towards females. However, the distribution of sex ratios in the *Wolbachia*-positive lineages is very wide due to broods

containing only males and broods containing only females (Fig. 2a). Such a distribution is typical of a population with mostly feminised males as reproductive females (Bouchon et al. 2008). Indeed, as the males are ZZ, there are mainly Z chromosomes in the lineage; this means that the offspring are mainly genetically males. If *wVulC* is not successfully transmitted in one brood, then the brood's phenotypic sex ratio would be highly biased towards males. On the contrary, if *wVulC* is well transmitted, the brood's phenotypic sex ratio is highly biased towards females. This means that *Wolbachia*-positive females are mainly feminised males, which is coherent to what was described in natural populations (Juchault et al. 1974). Our crossing data also showed that *wVulC* reduces the brood size of 1-year-old females, which is an additional measurement of the virulence of this symbiont.

Recently, Braquart-Varnier et al. (2008) showed that *wVulC* does not only interplay with its host's reproduction but also with its immunity. They demonstrated (as confirmed here with another lineage of *A. vulgare*) that 2-year-old phenotypic middle-aged females naturally infected by *wVulC*, but also genetic females experimentally infected by the same strain of *Wolbachia*, underwent a strong reduction in haemocyte densities. Here, we show that middle-aged phenotypic females infected by *wVulC* also exhibit low PO activity levels, strengthening their putative immunodepressive state. As stated before, in this lineage, phenotypic females infected by *wVulC* would be mainly feminised males. In terms of haemocyte density, phenotypic females infected by *wVulC* are clearly different from males (Fig. 3a). However, for PO activity, the distributions for phenotypic infected females are close to distributions for males (Fig. 3b). This means that we cannot tell whether the decrease in PO activity observed between *Wolbachia*-negative and -positive females is due to a direct impact of *Wolbachia* on this immune parameter or to a side effect of feminisation.

Fagutao et al. (2009) proposed that, in crustaceans, proPO has important roles not only in defending against pathogens but also in maintaining normal functioning essential for survival, especially haematopoiesis. The immunosuppressive state of middle-aged females fit quite well with this hypothesis, as lowest haemocyte densities correspond to lowest PO activities. However, PO activities and haemocyte densities do not seem to be directly linked in younger males and females. By studying females at two different ages, we show that the negative effect of *wVulC* on immune parameters is not as strong in all the female life stages: In 1-year-old females, *Wolbachia* negatively impacts only PO activity. It is only through aging that *wVulC* clearly interferes with both immune parameters measured. This could be interpreted as an acceleration of senescence due to *Wolbachia*, as already proposed in mosquitoes

infected by *wMelPop* (Evans et al. 2009). This interpretation is supported by the fact that, in insect cells, *Wolbachia* have been suspected to modify the expression of proteins linked to oxidative stress regulation, which is an important parameter in the senescence process (Finkel and Holbrook 2000; Brennan et al. 2008; Kremer et al. 2009).

In conclusion, *wVulC* exhibits a strong virulence on *A. vulgare*'s life history traits: decrease on survival (Braquart-Varnier et al. 2008), on fertility and on immune parameters. Infection with *wVulC* even appears to be the strongest cause of variability on PO activities between individuals. We show here that *Wolbachia* affects total phenoloxidase activity of *A. vulgare* females through their entire lifetime. It could be that, early in its host's life, *wVulC* would cause a decrease in the synthesis of protein(s) responsible for PO activity, leading in the long term to a stronger alteration of immune parameters in middle-aged females. This alteration may come from a global action of *Wolbachia* (e.g. feminisation) or from a specific action of this symbiont on immunity. Whatever mechanism is involved, it appears that the symbiosis between *wVulC* and *A. vulgare* is a conflicting one and can be seen in some aspects as a host–parasite interaction far from the peaceful harmony often predicted in vertically transmitted symbiosis.

Acknowledgements We thank Sébastien Moreau for advice in adapting PO measurement to terrestrial isopods and Maryline Raimond for technical assistance. We thank Richard Cordaux, Jessica Dittmer and three anonymous referees for their comments on a previous version of this manuscript. This research was funded by the CNRS, the Université de Poitiers and the Agence Nationale de la Recherche (EndoSymbArt ANR-06-BLAN-0316).

References

- Bouchon D, Cordaux R, Grève P (2008) Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: Bourtzis K, Miller T (eds) *Insect Symbiosis*. pp. 273–294.
- Box EP, Cox DR (1964) An analysis of transformations. *J R Stat Soc B* 26(2):211–252
- Braquart-Varnier C, Lachat M, Herbinier J, Johnson M, Caubet Y, Bouchon D, Sicard M (2008) *Wolbachia* mediate variation of host immunocompetence. *PLoS One* 3(9):e3286
- Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR, Harris HL (2008) The endosymbiont *Wolbachia pipientis* induces the expression of host antioxidant proteins in an *Aedes albopictus* cell line. *PLoS One* 3(5):e2083
- Cerenius L, Lee BL, Soderhall K (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* 29(6):263–271
- Cerenius L, Babu R, Soderhall K, Jiravanichpaisal P (2010) In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J Invertebr Pathol* 103(1):21–23
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity* 93(1):78–84, 6800482

- DeVeale B, Brummel T, Seroude L (2004) Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell* 3(4):195–208
- Evans O, Caragata EP, McMeniman CJ, Woolfit M, Green DC, Williams CR, Franklin CE, O'Neill SL, McGraw EA (2009) Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipiensis*. *J Exp Biol* 212(Pt 10):1436–1441
- Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, Hirono I (2009) Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS J* 276(18):5298–5306
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239–247
- Fytrou A, Schofield PG, Kraaijeveld AR, Hubbard SF (2006) *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proc Biol Sci* 273(1588):791–796
- Gross R, Vavre F, Heddi A, Hurst GD, Zchori-Fein E, Bourtzis K (2009) Immunity and symbiosis. *Mol Microbiol* 73(5):751–759
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322(5902):702
- Herbinere J, Braquart-Varnier C, Greve P, Strub JM, Frere J, Van Dorsselaer A, Martin G (2005) Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Dev Comp Immunol* 29(6):489–499. doi:10.1016/j.dci.2004.11.001
- Herbinere J, Greve P, Strub JM, Thierse D, Raimond M, van Dorsselaer A, Martin G, Braquart-Varnier C (2008) Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*. *Dev Comp Immunol* 32(8):875–882. doi:10.1016/j.dci.2008.01.007
- Jaenicke E, Fraune S, May S, Irmak P, Augustin R, Meesters C, Decker H, Zimmer M (2009) Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? *Dev Comp Immunol* 33(10):1055–1063
- Juchault P, Legrand JJ, Martin G (1974) Action interspécifique du facteur épigénétique féminisant responsable de la thélygénie et de l'intersexualité du Crustacé *Armadillidium vulgare* (Isopode Oniscoïde). *Ann Embryol Morphog* 7(3):265–276
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6196–6200
- Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F (2009). *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog* 5(10)
- Kurtz J, Sauer KP (2001) Gender differences in phenoloxidase activity of *Panorpa vulgaris* hemocytes. *J Invertebr Pathol* 78(1):53–55
- Kurtz J, Wiesner A, Gotz P, Sauer KP (2000) Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Dev Comp Immunol* 24(1):1–12
- Leclerc V, Pelte N, El Chamy L, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, Reichhart JM (2006) Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep* 7(2):231–235
- Liu H, Jiravanichpaisal P, Cerenius L, Lee BL, Soderhall I, Soderhall K (2007) Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 282(46):33593–33598
- Martin G, Juchault P, Legrand JJ (1973) Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbiote de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* L. dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des mâles génétiques de la lignée thélygène. *C R Acad Sci III* 276:2313–2316
- May RC (2007) Gender, immunity and the regulation of longevity. *Bioessays* 29(8):795–802
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139(7):1268–1278
- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(36):12795–12800
- Oliver KM, Campos J, Moran NA, Hunter MS (2008) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc Biol Sci* 275(1632):293–299
- Oliver KM, Degnan PH, Hunter MS, Moran NA (2009) Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science* 325(5943):992–994
- Osborne SE, Leong YS, O'Neill SL, Johnson KN (2009) Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathog* 5(11)
- Radhika A, Abdul Nazar AK, Munuswamy N, Nellaiappan K (1998) Sex-linked in phenol oxidase in the fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* Baird and their possible role (Crustacea: Anostraca). *Hydrobiologia* 377:161–164
- Ramsden S, Cheung YY, Seroude L (2008) Functional analysis of the *Drosophila* immune response during aging. *Aging Cell* 7(2):225–236
- Rigaud T, Moret Y (2003) Differential phenoloxidase activity between native and invasive gammarids infected by local acanthocephalans: differential immunosuppression? *Parasitology* 127(Pt 6):571–577
- Rigaud T, Souty Grosset C, Raimond R, Mocquard JP, Juchault P (1991) Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): Recent acquisitions. *Endocytobiosis Cell Res* 7:259–273
- Roberts ML, Buchanan KL, Evans ML (2004) Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Anim Behav* 68:227–239
- Rolff J (2001) Effect of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Libellulidae) from a wild population. *Can J Zool* 79:2176–2180
- Saridaki A, Bourtzis K (2009) *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Curr Opin Microbiol* 13(1):67–72
- Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HC (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310(5755):1781
- Schulenburg H, Kurtz J, Moret Y, Siva-Jothy MT (2009) Introduction. *Ecological immunology*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1513):3–14
- Sizemore RK, Colwell R, Tubiash HS, Lovelace TE (1975) Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: numerical taxonomy. *Appl Microbiol* 19(3):393–399
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6(12)

RESEARCH

Open Access

Feminizing *Wolbachia*: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*

Frédéric Chevalier¹, Juline Herbinière-Gaboreau¹, Delphine Charif², Guillaume Mitta³, Frédéric Gavory⁴, Patrick Wincker⁴, Pierre Grève¹, Christine Braquart-Varnier¹, Didier Bouchon^{1*}

Abstract

Background: *Wolbachia* are vertically transmitted bacteria known to be the most widespread endosymbiont in arthropods. They induce various alterations of the reproduction of their host, including feminization of genetic males in isopod crustaceans. In the pill bug *Armadillidium vulgare*, the presence of *Wolbachia* is also associated with detrimental effects on host fertility and lifespan. Deleterious effects have been demonstrated on hemocyte density, phenoloxidase activity, and natural hemolymph septicemia, suggesting that infected individuals could have defective immune capacities. Since nothing is known about the molecular mechanisms involved in *Wolbachia*-*A. vulgare* interactions and its secondary immunocompetence modulation, we developed a transcriptomics strategy and compared *A. vulgare* gene expression between *Wolbachia*-infected animals (*i.e.*, “symbiotic” animals) and uninfected ones (*i.e.*, “asymbiotic” animals) as well as between animals challenged or not challenged by a pathogenic bacteria.

Results: Since very little genetic data is available on *A. vulgare*, we produced several EST libraries and generated a total of 28 606 ESTs. Analyses of these ESTs revealed that immune processes were over-represented in most experimental conditions (responses to a symbiont and to a pathogen). Considering canonical crustacean immune pathways, these genes encode antimicrobial peptides or are involved in pathogen recognition, detoxification, and autophagy. By RT-qPCR, we demonstrated a general trend towards gene under-expression in symbiotic whole animals and ovaries whereas the same gene set tends to be over-expressed in symbiotic immune tissues.

Conclusion: This study allowed us to generate the first reference transcriptome ever obtained in the Isopoda group and to identify genes involved in the major known crustacean immune pathways encompassing cellular and humoral responses. Expression of immune-related genes revealed a modulation of host immunity when females are infected by *Wolbachia*, including in ovaries, the crucial tissue for the *Wolbachia* route of transmission.

Background

Wolbachia are endosymbiotic α -Proteobacteria that are maternally transmitted and cause various reproductive manipulations in a wide range of invertebrate hosts (see [1] for a review). *Wolbachia* infection is widespread in Crustacea where species of the three main classes (Malacostraca, Ostracoda, and Maxillipoda) were found to be infected [2]. *Wolbachia* prevalence reaches ~60% in terrestrial isopods (order Oniscidea). In the pill bug

Armadillidium vulgare, one of the most intensively studied examples, *Wolbachia* are responsible for inducing the development of genetic males into functional females. This is achieved by preventing the androgenic gland differentiation responsible for male development [3,4]. Consequently, in the progenies of infected mothers the proportion of females reaches 70 to 80% according to the transmission rate of *Wolbachia* [5,6]. This modification of the host sex ratio leads to a low proportion of males in the field reached 20% as evidenced by a meta-analysis of 57 populations [2]. Since *Wolbachia* vertical transmission is dependent on the reproductive success of their hosts, it could be expected that the infection

* Correspondence: didier.bouchon@univ-poitiers.fr

¹Université de Poitiers, Laboratoire Écologie, Évolution, Symbiose, UMR CNRS 6556, 40 avenue du recteur Pineau, F-86022 Poitiers cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article

provides fitness benefit that could promote dispersion of *Wolbachia* in the host population. Surprisingly, most field populations of *A. vulgare* are not infected by *Wolbachia* [2], which could reflect the conflicting relationships between the pill bug and the bacteria. As some life history traits of *A. vulgare* are directly impacted by *Wolbachia*, the low prevalence of the infected specimens in natural populations could be due to various factors that reduce the host fitness. Feminizing *Wolbachia* have the potential to reduce male to female ratio to values limiting mating possibilities and therefore limiting population size [7]. Furthermore, males are able to distinguish between infected and uninfected females [7]. This mating preference could lead to a sexual selection in favor of uninfected females. Rigaud and Moreau [8] also demonstrated that after multiple mating, sperm depletion in males affects fertility only in infected females. In addition, a reduced fertility and survival is recorded in *Wolbachia*-infected females [6,9,10]. However, these females had a higher reproductive investment (they produce more offspring and more eggs per clutch) so ultimately the reproductive success is similar between infected and non-infected females [6]. More recently, deleterious effects have been demonstrated on immunocompetence of infected females [10,11]. Indeed, these females have a lower hemocyte density, a decrease in PO activity, and a more severe hemolymph septicemia that could result in a reduced life span in *A. vulgare* [10,11]. This latter effect could impact host fitness including lower or higher resistance to intruders as it has been shown in many insect species [12]. For example, it has been demonstrated that *Wolbachia* suppress the host defence of *Drosophila simulans* against parasitoids [13]. Conversely, *Wolbachia*-induced stimulation of the host's innate immune system has been suggested as a mechanism conferring resistance to pathogens. In *D. melanogaster* and *D. simulans*, *Wolbachia* protect their hosts against RNA viral infection [14-16]. This has also been demonstrated in *Aedes aegypti* where the injection of the life-shortening *wMelPop* *Wolbachia* strain provides resistance against the Dengue and the Chikungunya viruses as well as against *Plasmodium galinaceum* and *Brugia pahangi* [12,17-21]. In parallel, *Wolbachia* were shown to induce immune gene expression in different biological systems. For example, a *Wolbachia*-infected cell line displayed an overexpression of antioxidant proteins that are key components of *Ae. albopictus* immune response [22,23]. Similarly, host immune genes are up-regulated in *Ae. aegypti* [17] and *Anopheles gambiae* [18] when infected by *wMelPop*.

Since nothing is known about the molecular mechanisms involved in *Wolbachia*-*A. vulgare* interactions and its secondary immunocompetence modulation, different Expressed Sequence Tag (EST) libraries [normalized,

non-normalized, and Suppression Subtractive Hybridization (SSH) libraries] were constructed in order to generate a large transcriptomics data set. To identify genes involved in *Wolbachia*-host association and in host immune response, EST and SSH libraries were prepared using RNA from ovaries (*i.e.*, the tissue involved in vertical transmission) and from *A. vulgare* females artificially challenged by *Salmonella typhimurium*. Host gene expression in *Wolbachia*-infected individuals was then compared to uninfected individuals by *in silico* and *in vitro* subtractions. This analysis revealed a set of potentially modulated immune genes. Expression of immune genes were investigated to examine whether the decrease of immunocompetence in the *Wolbachia*-infected *A. vulgare* may be related to modulation of the host innate immune system.

Methods

This work has been conducted in parallel in two other invertebrate models (*i.e.*, *Asobara tabida*-*Wolbachia* and *Sitophilus oryzae*-SPE (*Sitophilus* primary endosymbiont)) in order to determine conserved and divergent immune pathways and to ascertain whether the invertebrates have selected common strategies to control their symbionts and to discriminate between symbionts and pathogens [24,25].

Symbiotic association

Armadillidium vulgare (Crustacea Isopoda) individuals were sampled from two laboratory lineages whose *Wolbachia*-infection status is known. Animals infected by the feminizing *Wolbachia* strain (*wVulC*) (*i.e.*, "symbiotic" animals) originated from Celles-sur-Belle, France. This lineage has been identified by crossing experiments as composed of all ZZ individuals: ZZ males and ZZ + *Wolbachia* females [2]. Uninfected individuals (*i.e.*, "asymbiotic" animals) with genetic sex determinism (ZZ males and WZ females) originated from Nice, France [2,5,26]. These lines have been stably maintained in the lab since 1967 and 1991 for asymbiotic and symbiotic lineages, respectively. As *A. vulgare* males are never infected by *Wolbachia*, only females (WZ females and ZZ+ *Wolbachia* females) were used in this study.

Bacterial challenge

Salmonella typhimurium (strain 12023G) were cultured in LB medium overnight. Dilutions were performed to obtain 10^4 bacteria μL^{-1} (OD=0.01). Asymbiotic females were injected with 1 μL of bacterial suspension at the side of sixth pereon segment using a thin glass needle. Females were dissected at 6h, 9h, and 15h post injection. Ovaries, gut, caeca, fat tissues, hemocytes, hematopoietic organ, nerve chain, and brain were conserved in liquid nitrogen separately until total RNA extractions.

Library constructions

Seven different EST libraries were prepared from different tissues of *A. vulgare* (Figure 1A). Total RNA was extracted as described in [27] and treated with DNase (TurboDNase, Ambio, Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions.

Two non-normalized libraries were constructed from asymbiotic and symbiotic ovaries (AO and SO) starting with 1 µg of polyA RNAs. They were prepared using Creator SMART cDNA Library Construction kit (Clontech/BD Biosciences), following the manufacturer's instructions. cDNA was digested by *Sfi*I, purified (BD Chroma Spin – 400 column) and ligated into pDNRlib vector for *Escherichia coli* transformation. Amplified double strand cDNA (ds cDNA) was prepared using a SMART approach [28]. SMART Oligo II oligonucleotide (Clontech/BD Biosciences) and CDS primer were used for first-strand cDNA synthesis. SMART-amplified

cDNA samples were further digested by *Rsa*I endonuclease.

The SSH libraries from asymbiotic and symbiotic ovaries (SSH-A and SSH-S) were constructed starting with 20 µg of total RNA. SSH libraries from specimens challenged and not challenged by *S. typhimurium* (SSH-C and SSH-NC) were performed on 20.4 µg of a total RNA equally pooled from different tissues (*i.e.*, ovaries, gut, cæca, fat tissues, hemocytes, hematopoietic organ, nerve chain, and brain) harvested at each time point. The pooled total RNA was obtained by mixing equal amounts of total RNA extracted separately for each tissue and for each time point. Subtractive hybridizations were performed using SSH method in both directions (Asymbiotic vs. Symbiotic A/S and vice-versa S/A; Not Challenged vs. Challenged NC/C and vice-versa C/NC) as described in [29,30] using the PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech/BD Biosciences). SSH libraries

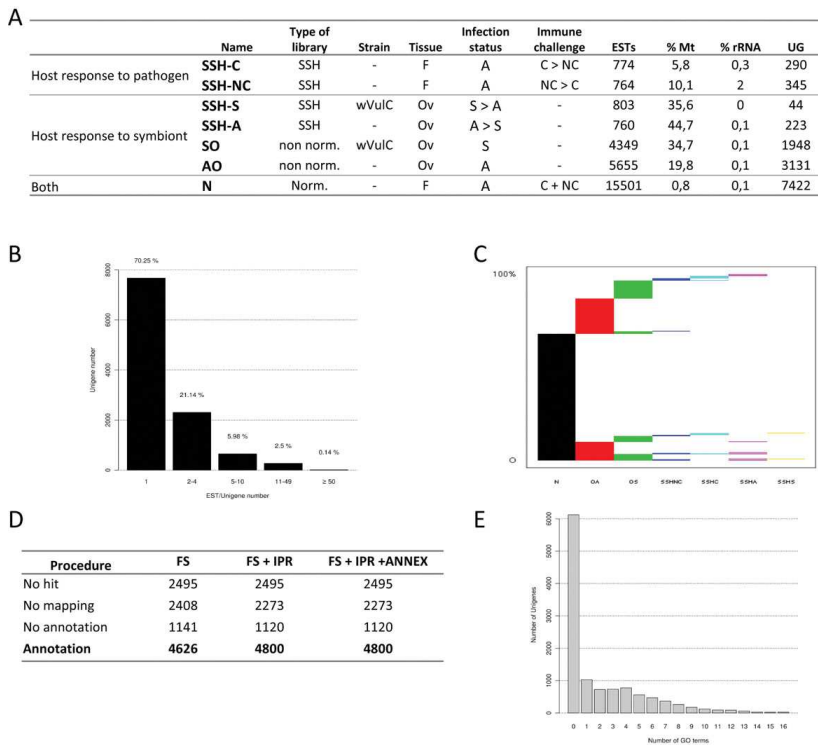


Figure 1 EST library characteristics A. Summary of the different EST libraries. Suppression Subtractive Hybridizations (SSHs) were performed with Mirror Orientation Selection procedure. cDNA libraries were sequenced with or without normalization (Norm. or Non Norm. respectively). The wVulC *Wolbachia* strain (Celles sur Belle, France) induces feminization of genetic males and has some negative impacts in symbiotic females (see text). Immune challenge was performed through the injection of 10^4 *Salmonella typhimurium* in asymbiotic females: RNA was extracted 6h, 9h, and 15h after challenge. F = whole female tissues, Ov = ovary tissues, S = symbiotic, A = asymbiotic, C = immune challenge, NC = no immune challenge, ESTs = expressed sequence tags, Mt = mitochondrial genes, rRNA = ribosomal genes, UG = number of unigenes. B. Abundance classes of ESTs and unigenes. C. Unigenes occurrences among EST libraries. The horizontal axe represents the different EST libraries, the vertical axe represents the occurrence of unigenes within the libraries. Horizontal reading of the graph indicates the percentage of unigenes shared by several libraries. D. GO annotation results for High Scoring Pairs (HSP) coverage of 0%. GO annotation was first conducted using the Score Function (SF) of the BLAST2GO software. The GO terms selected by the annotation step were then merged with InterProScan predictions (SF + IPR). Finally, the Annex annotation was run (SF + IPR + ANNEX). E. Annotation distribution of GO terms.

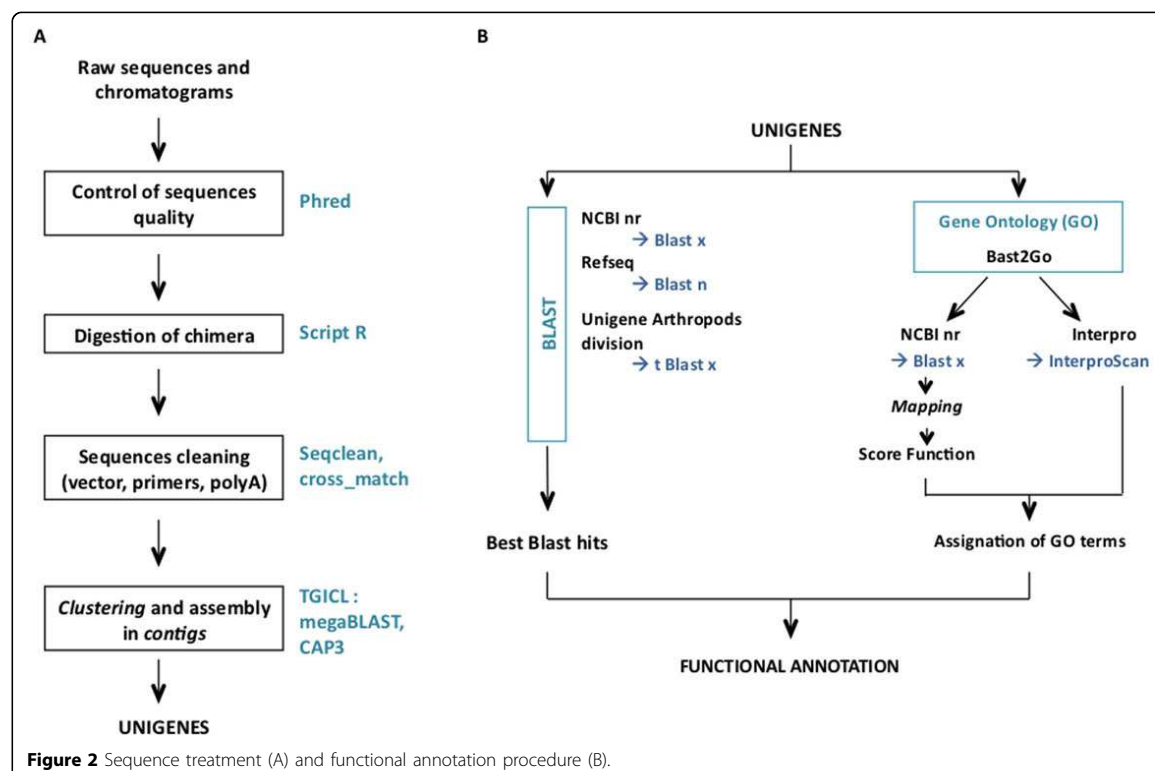
were prepared by Evrogen (Moscow, Russia). The Mirror Orientation Selection (MOS) procedure was used for SSH-A/S and SSH-C/NC as described in [31] in order to reduce the number of false-positive clones in the SSH-generated libraries. Purified cDNAs from SSH-A/S and SSH-C/NC were cloned into the pAL16 vector (Evrogen) and used for *E. coli* transformation.

Finally, the normalized library (N) was prepared with 75 µg of a pooled total RNA from an equimolar proportion of asymbiotic and symbiotic ovaries, and 6h, 9h, and 15h challenged asymbiotic females. As for the libraries of challenged specimens, total RNA was extracted separately from the same tissues. This N library was prepared by Evrogen (Moscow, Russia). Total RNA sample was used for ds cDNA synthesis using SMART approach [28]. SMART prepared amplified cDNA was then normalized using Duplex Specific Nuclease (DSN) normalization method [32]. Normalization included cDNA denaturation/reassociation, treatment by DSN [33] and amplification of normalized fraction by PCR. Normalized cDNA was purified using QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), digested with *Sfi*I, purified (BD Chroma Spin - 1000 column) and ligated into pAL 17.3 vector (Evrogen) for *E. coli* transformation.

EST sequencing and data processing

All clones from the libraries were sequenced using the Sanger method (Genoscope, Evry, France) and were deposited in the EMBL database [EMBL: FQ884936 to FQ908260]. A general overview of the EST sequence data processing is given in Figure 2. Raw sequences and trace files were processed with Phred software [34] in order to remove low quality sequences (score < 20). Sequence trimming, which includes polyA tails/vector/adaptor removal, was performed by cross match. Chimerical sequences were computationally digested into independent ESTs. Clustering and assembly of the ESTs were performed with TGICL [35] to obtain unique transcripts (unigenes) composed of contiguous ESTs (contigs) and unique ESTs (singletons). For that purpose, a pairwise comparison was first performed by a modified version of megaBLAST (minimum similarity 94%). Clustering was done with tclust that proceeds by a transitive approach (minimum overlap: 60bp at 20bp maximum of the end of the sequence). Assembly was done with CAP3 (minimum similarity 94%).

To detect unigene similarities with other species, several BLASTs (with a high cut-off e-values) were performed against the following databases: NCBI nr [BLASTx (release: 1 March 2011); e-value < 5, HSP



length > 33aa], Refseq genomic database (BLASTn, e-value < 10), Unigene division Arthropods (tBLASTx, #8 *Ae. aegypti*, #37 *An. gambiae*, #3 *Apis mellifera*, #3 *Bombyx mori*, #53 *D. melanogaster*, #9 *Tribolium castaneum*; e-value < 5), and *Wolbachia* sequences from Genbank (Release 164; e-value < $1e^{-20}$). Gene Ontology (GO) annotation was carried out using BLAST2GO software [36]. In the first step (mapping), a pool of candidate GO terms was obtained for each unigene by retrieving GO terms associated to the hits obtained after a BLASTx search against NCBI nr. In the second step (annotation), reliable GO terms were selected from the pool of candidate GO terms by applying the Score Function of BLAST2GO with “permissive annotation” parameters (EC-weight=1, e-value-filter=0.1, GO-weight=5, HSP/hit coverage cut-off =0%). In the third step of the annotation procedure, the pool of GO terms selected during the annotation step was merged with GO terms associated to InterPro domain (InterProScan predictions based on the longest ORF). Finally, the Annex augmentation step was run to modulate the annotation by adding GO terms coming from implicit relationships between GO terms [37].

Statistical analyses on libraries

We used the randomization procedure (with 500 random datasets) and *R* statistics described in [38] to detect unigenes whose transcript abundance (number of ESTs) was statistically different in AO and SO libraries (at a false discovery rate of 2.5 %). In order to extract biological processes and molecular functions statistically over-represented in SO libraries, we performed a hyper-geometrical test between GO terms from the SO library and those from the AO library, which represents the natural physiological conditions. The p-values were then adjusted using Bonferroni's correction.

In order to perform a functional enrichment analysis of the unigenes extracted from the SSH, we used the FatiGO web tool [39] against the SO library. With respect to the GO analysis, four different levels of description (3, 4, 6, and 9) were chosen for the biological processes.

Quantitative expression by Real-Time RT-PCR

Gene expression quantification was performed in whole animal, ovaries, and immune tissues (hemocytes and hematopoietic organs pooled) of asymbiotic and symbiotic females.

RNA extractions

For the whole animal condition, each individual was crushed with pestle and mortar in liquid nitrogen. Total RNA extraction was performed from about 30 mg of powder with TRIzol[®] reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For ovaries and

immune tissues, total RNA extractions were performed from 25 and 50 females respectively with RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN).

Real-Time RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized with the SuperScript III kit (Invitrogen) in accordance with manufacturer's instructions, starting from 1 µg of total RNA using random hexamer primers. For whole animal samples, 0.2 µg of 5 individual extractions were pooled in 1 µg. Three biological replicates of each sample (whole animals, ovaries, and immune tissues) were used.

For each gene, primer pairs were designed with the Real-time PCR function of PerlPrimer [40]. The *T_m* and the length of each primer pair were fixed at 60°C and 18-22 bp, respectively. Primers used for quantitative PCR are summarized in Additional File 1.

Quantitative RT-PCR was performed using LightCycler LC480 system (Roche) as follows: 10 min at 95°C, 45 times [10 sec at 95°C, 10 sec at 60°C, 20 sec at 72°C]. A melting curve (65°C to 97°C) was recorded at the end of each reaction in order to check that the PCR product was unique. The reaction mixture consisted of 1.25 µL of each primer (10 µM), 5 µL of Fast SYBR-Green Master Mix (Roche) and 2.5 µL of diluted cDNA (corresponding to 12.5 ng of cDNA). Standard curves were plotted using 4 dilutions (125 ng, 25 ng, 5 ng, 1.25 ng) of pooled cDNAs from whole animals and ovaries. Efficiency of the PCR reaction was calculated.

Expression data for each gene were estimated using the efficiency of the primer pair and the crossing point [41]. All gene expressions were normalized by the geometric mean of the expression level of the L8-ribosomal (RbL8) and Elongation Factor 2 (EF2) reference genes. Normalization and statistical pair-wise comparisons have been determined using REST [42].

Results

First reference transcriptome in isopods

ESTs were generated from seven high quality cDNA libraries, including four SSH libraries, two non-normalized libraries and one normalized library. Characteristics of cDNA libraries are summarized in Figure 1A. A total of 28 606 ESTs (mean length: 504 ± 170 bp) were generated which covered around 14.4 Mb. Clustering of all EST sequences was performed by TGICL [35] resulted in 10 923 unique transcripts (*i.e.*, unigenes which covered 6.4 Mb). About 75% of the clusters contained one EST (*i.e.*, singletons; *n* = 8 211) and 25% contained ESTs assembled in a consensus sequence (*i.e.*, contigs, *n* = 2 712). The normalized library and the ovary libraries contained a greater proportion of contigs which is likely due to the deeper sequencing of these libraries (Figure 1C.). The average length of these unigenes was 590 ±

250 bp with a GC content of 33.5% and an average coverage of 3.5 (Figure 1B)

Functional annotation was performed on all 10 923 unigenes through BLASTx and tBLASTx similarity searches against various databases. Because of the ancient divergence between *A. vulgare* and the closest sequenced genomes we used a cut-off threshold of $1e^{-05}$. A total of 44% of the unigenes had BLAST similarities to known sequences, mainly from *Ae. aegypti* (10.5%), *An. gambiae* (8.7%), *D. melanogaster* (7%), and different malacostracans (3.1%) with an e-value lower than $1e^{-20}$ for 64.8% of the unigenes. The remaining 66% of unigenes showing no match could correspond to species-specific genes or UTR extremities of the cDNA.

Functional analysis

GO annotation was carried out using BLAST2GO software (Figures 1D, 2B). A total of 42% of unigenes were annotated after the BLAST2GO annotation procedure for High Scoring Pair (HSP) coverage of 0%. While we kept the unigenes/GO dataset corresponding to the minimum HSP coverage percentage, the mean number of GO terms assigned per unigene was low (1.18 GO term/unigene, Figure 1E).

To determine the effect of *Wolbachia* on host gene expression, an *in silico* subtraction was performed between libraries of symbiotic (SO) and asymbiotic (AO) ovaries. In these libraries, a total of 4564 unigenes have been annotated and based on the *R* statistics, only 6 unigenes were differentially represented: 3 unigenes were over-represented in symbiotic ovaries while 3 were

over-represented in asymbiotic ovaries. Unfortunately, these unigenes could not be identified by BLAST and only one is associated to a biological function (see Additional File 2: Unigenes differentially represented between symbiotic and asymbiotic ovaries). The immune processes were over-represented in symbiotic ovaries (Table 1 and Additional File 3: Processes and functions over-represented in *A. vulgare* ovaries in response to *Wolbachia* infection, biological process levels 4 and 6). Indeed, 21 and 15 unigenes with immune gene similarities were identified in AO and SO libraries, respectively (Additional File 4: Immune unigenes present in SO, AO, SSH-S, SSH-A, SSH-C, and SSH-NC libraries).

In the same manner, two *in vitro* SSHs were performed by subtracting common transcripts between symbiotic and asymbiotic ovaries (SSH-S), and reciprocally (SSH-A). These SSHs were contaminated by a high proportion of mitochondrial ESTs (~40%) that were removed for further analyses. To reveal the functions over-represented, we compared each SSH to SO library by the FatiGO web tool. One biological process (vesicle transport along microtubule) and one molecular function (microtubule motor activity) were over-represented in asymbiotic ovaries (Table 2). Most of the 223 unigenes that are associated to these two GO terms belong to the kinesin-like protein family. In these two libraries, the BLAST analyses allowed the identification of 1 immune gene in SSH-S and 6 immune genes in SSH-A libraries respectively (Additional File 4: Immune unigenes present in SO, AO, SSH-S, SSH-A, SSH-C, and SSH-NC libraries).

Table 1 Functions over-represented in *A. vulgare* ovaries in response to *Wolbachia* infection.

	Biological process	GO accession	A	S	A/S
AO ~ SO level 3 (n= 99)	cell fate determination	GO:0001709	0.02	0.05	0.40
	immune effector process	GO:0002252	0.07	0.16	0.44
	regulation of immune system process	GO:0002682	0.04	0.14	0.29
	generation of a signal involved in cell-cell signaling	GO:0003001	0.04	0.05	0.80
	muscle contraction	GO:0006936	0.02	0.07	0.29
	chromosome segregation	GO:0007059	0.18	0.23	0.78
	ensheathment of neurons	GO:0007272	0.00	0.02	0.00
	circadian rhythm	GO:0007623	0.07	0.09	0.78
	cell recognition	GO:0008037	0.02	0.07	0.29
	reproductive behavior	GO:0019098	0.04	0.05	0.80
	membrane docking	GO:0022406	0.04	0.05	0.80
	viral reproductive process	GO:0022415	0.02	0.05	0.40
	cellular pigmentation	GO:0033059	0.04	0.05	0.80
	leukocyte activation	GO:0045321	0.05	0.09	0.56
	regulation of response to stimulus	GO:0048583	0.12	0.18	0.67
	coagulation	GO:0050817	0.09	0.11	0.82
	regulation of body fluid levels	GO:0050878	0.04	0.05	0.80
	endocrine process	GO:0050886	0.11	0.14	0.79
	cellular response to stimulus	GO:0051716	0.05	0.07	0.71

Table 2 Functional enrichment analysis: list of GO terms that were over-represented in the lists of unigenes obtained by SSH experiments on ovaries (FatiGO web tool). P-value of Fisher's exact unilateral tests. Adjusted p-value for multiple test correction.

Test	# unigenes	Ontology domain	Level	Term	GO ID	p-value	Adj. p-value
SSH-A versus SO	223	Biological process	9	vesicle transport along microtubule	GO:0047496	1.35E-04	5.97E-02
		Molecular function	3	microtubule motor activity	GO:0003777	1.13E-03	9.85E-02
SSH-S versus SO	44	no significant term					

In order to identify genes expressed in response to pathogenic bacteria, we performed SSH libraries between *S. typhimurium*-challenged and unchallenged asymbiotic *A. vulgare* females (SSH-C) and reciprocally (SSH-NC). We thus identified 31 and 29 unigenes in SSH-C and SSH-NC libraries, respectively, that are related to crustacean immune processes. In the SSH-C library these immune related unigenes exhibited a greater diversity than those of the SSH-NC library (Additional File 4: Immune unigenes present in SO, AO, SSH-S, SSH-A, SSH-C, and SSH-NC libraries).

Finally, 30 non redundant immune related unigenes were identified in libraries constructed from symbiotic/asymbiotic conditions (SO/AO, SSH-S/SSH-A) and 59 in libraries constructed from challenged/not challenged conditions (SSH-C/SSH-NC) (Additional File 3: Processes and functions over-represented in *A. vulgare* ovaries in response to *Wolbachia* infection, biological process levels 4 and 6). Among them, 28 unigenes were successfully amplified by PCR. In addition, 16 other unigenes were selected from the normalized library (N) for their putative involvement in major immune processes. Annotations were further confirmed by protein domain identification (CD Search vs the Conserved Domain Database on NCBI server [43]). If the complete domain pattern of a given protein was not found, the suffix "-like" was added to the unigene name (Table 3). Expression of these 44 genes were further analysed by RT-qPCR.

Immune gene expression

The expression of 46 candidate immune genes (Table 4 and Additional File 1: Primer pairs used for RT-qPCR quantification) were quantified in whole animal, ovaries and immune tissues of symbiotic and asymbiotic *A. vulgare* females. Forty four genes were selected through the procedure described above and 2 other genes were selected from previous studies [44,45]. Twelve genes were selected from the SSH-C (11 unigenes) and SSH-NC (1 unigene) libraries in order to examine whether *Wolbachia* induce an immune activation as observed in a challenged condition. All the 46 selected immune genes can be placed in known crustacean immune pathways (Figure 3). We considered genes involved i) in pathogen recognition (receptors

and associated signaling pathways), ii) in RNA interference (RNAi), coagulation, PO pathway, phagocytosis, apoptosis, and autophagy or iii) encoding antimicrobial peptides (AMPs) [46-50].

In symbiotic conditions, expression of these genes showed a general trend to a down-regulation in whole animals (37/43) and ovaries (31/44). On the contrary, 30 genes among 37 are over-expressed in immune tissues (Table 4 and Additional File 5: Expression profiles of genes studied in whole animals, ovaries, and immune tissues of *A. vulgare*).

Significant differential expressions in whole animals and ovaries were recorded for 16 genes, 12 of them were down-regulated and 4 up-regulated (Table 4). No significant differential expression was detected in immune tissues. Three genes involved in pathogen recognition, the C-type lectin 1, C-type lectin 2, and the C-type lectin 3 genes were differentially expressed. The C-type lectin 1 was up-regulated in ovaries whereas the C-type lectin 2 was down-regulated in the same tissue. Finally, the C-type lectin 3 was down-regulated in the whole animals. Three genes encoding AMPs were down-regulated: The armadillidin and the i-type lysozyme genes in whole animals and the crustin3 gene in both whole animals and ovaries. One serine protease gene, the masquerade-like B, was also under-expressed in whole animals. Three genes involved in detoxification, the peroxiredoxin A and C and glutathione peroxidase, were down-regulated in ovaries whereas the thioredoxin A was up-regulated in the same tissue. In the autophagy pathway, two genes, atg7 and atg12, were under-expressed in ovaries. Among genes involved in stress response, the ferritin A and C genes were over-expressed in ovaries.

Discussion

The different EST libraries generated in this study constitute the first reference transcriptome ever obtained in the Isopoda group [51]. Among crustaceans, only the *Daphnia pulex* (Branchiopoda, Cladocera) genome was recently published [52] and some EST libraries were constructed from a shrimp, a crayfish, and a porcelain crab (Malacostraca, Decapoda) [53-57]. Another EST database was obtained in the marine isopod *Limnoria quadripunctata*, but it concerned only the

Table 3 List of immune genes identified in the libraries.

	Biological function	Gene	BLAST program	Accession	Description	Species	e-value	Query coverage	Max identity	SSH-C	SSH-NC	Library occurrences				
												SSH-S	SSH-A	SO	AO	N
Pathogen detection	Recognition	C-type lectin 1	blastx	ABA54612.1	C-type lectin 1	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	5E-03	0.44	0.21							x
			tblastx	DQ871245.1	C-type lectin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	8E-09	0.27	0.48							
		C-type lectin 2	blastx	ACR56805.1	C-type lectin	<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	1E-08	0.39	0.30				x		x	x
			tblastx	CP000576.1	Prochlorococcus marinus str. MIT 9301	<i>Prochlorococcus marinus</i>	9E-05	0.12	0.50							
		C-type lectin 3	blastx	ACC86854.1	C-type lectin-like domain-containing protein PtLP	<i>Portunus trituberculatus</i>	1E-09	0.74	0.27							x
			tblastx	EU477491.1	C-type lectin-like domain-containing protein PtLP	<i>Portunus trituberculatus</i>	4E-14	0.56	0.65							
		Peroxinectin-like A	blastx	XP_002435528.1	Peroxinectin, putative	<i>Ixodes scapularis</i>	8E-27	0.85	0.32		x					x
			tblastx	XM_002406272.1	Peroxinectin, putative	<i>Ixodes scapularis</i>	1E-41	0.76	0.36							
		Peroxinectin-like B	blastx	XP_002406316.1	Peroxinectin, putative	<i>Ixodes scapularis</i>	7E-23	0.70	0.38		x					
			tblastx	EU934306.1	TSA: AD-573 salivary peroxidase	<i>Anopheles darlingi</i>	6E-23	0.52	0.48							
	Transduction	ECSIT	blastx	BAI40012.1	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	5E-43	0.58	0.59							x
			tblastx	AB491495.1	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	3E-51	0.63	0.60							
		MyD88-like	blastx	XP_001658635.1	Myd88	<i>Aedes aegypti</i>	4E-08	0.50	0.29							x
			tblastx	XM_001658585.1	Myd88	<i>Aedes aegypti</i>	4E-07	0.41	0.27							
		SOCS2-like	blastx	BAI70368.1	suppressor of cytokine signaling-2 like	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	9E-35	0.81	0.47							x
			tblastx	AB516427.1	suppressor of cytokine signaling-2 like	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	2E-34	0.74	0.50							
	Immune response	ALF 1	blastx	ABP73291.1	anti-lipopolysaccharide factor isoform 2	<i>Penaeus monodon</i>	2E-26	0.39	0.59							x
			tblastx	AB453738.1	MjALF2	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	8E-30	0.40	0.58							
		ALF 2	blastx	BAH22585.1	anti-lipopolysaccharide factor 2	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	2E-05	0.68	0.28		x					
			tblastx	AB453738.1	MjALF2	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	8E-19	0.79	0.40							
		Crustin 1	blastx	ACU25385.1	Crustin 4	<i>Panulirus japonicus</i>	5E-22	0.43	0.55							x
			tblastx	FJ797417.1	Crustin 1 (PJC1)	<i>Panulirus japonicus</i>	7E-24	0.47	0.58							

Table 3 List of immune genes identified in the libraries. (Continued)

Serine proteases	Crustin 2	blastx	ACU25385.1	Crustin 4	<i>Panulirus japonicus</i>	1E-10	0.44	0.48			x
		tblastx	FJ797420.1	Crustin 1 (PJC1)	<i>Panulirus japonicus</i>	7E-34	0.35	0.66			
	Crustin 3	blastx	ACU25382.1	Crustin 1	<i>Panulirus japonicus</i>	2E-28	0.35	0.65			x
		tblastx	FJ797417.1	Crustin 1 (PJC1)	<i>Panulirus japonicus</i>	6E-34	0.44	0.53			
	I-type lysozyme	blastx	ACZ63472.1	i-type lysozyme-like protein 2	<i>Penaeus monodon</i>	7E-41	0.70	0.67			x
		tblastx	GQ478704.1	i-type lysozyme-like protein 2	<i>Penaeus monodon</i>	1E-42	0.57	0.62			
	Masquerade-like A	blastx	ABY64694.1	Masquerade-like protein	<i>Armadillidium vulgare</i>	2E-112	0.50	0.99	x		x
		tblastx	EU216755.1	Masquerade-like protein	<i>Armadillidium vulgare</i>	5E-134	0.50	0.99			
	Masquerade-like B	blastx	CAA72032.2	Masquerade-like protein	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	2E-86	0.67	0.47	x		x x
		tblastx	EU216755.1	Armadillidium vulgare masquerade-like protein	<i>Armadillidium vulgare</i>	1E-97	0.37	0.75			
Serine protease inhibitors	a2-macroglobulin A	blastx	ABY64692.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Armadillidium vulgare</i>	1E-119	0.99	1.00	x		x
		tblastx	EU216753.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Armadillidium vulgare</i>	6E-152	1.00	1.00			
	a2-macroglobulin B	blastx	AAX24130.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Penaeus monodon</i>	2E-06	0.28	0.54			x
		tblastx	DQ988330.2	alpha 2 macroglobulin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	2E-81	0.54	0.57			
	a2-macroglobulin C	blastx	ABI79454.2	alpha 2 macroglobulin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	6E-27	0.38	0.51		x	
		tblastx	AY826818.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Penaeus monodon</i>	1E-12	0.35	0.52			
	a2-macroglobulin D	blastx	BAC99073.1	alpha2-macroglobulin	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	1E-10	0.84	0.26			x
		tblastx	EF073268.2	alpha-2-macroglobulin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	4E-35	0.36	0.44			
	a2-macroglobulin E	blastx	ABK60046.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	5E-43	0.98	0.42	x		
		tblastx	EF073269.1	alpha-2-macroglobulin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	6E-64	0.97	0.48			
Regulation of granular secretion	Cyclophylin G	blastx	ADD18906.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	1E-62	0.72	0.71		x	
		tblastx	EZ543483.1	TSA: Crepidula fornicata 3374.Cfedg	<i>Crepidula fornicata</i>	7E-74	0.67	0.70			
RNAi	Piwi	blastx	XP_002155913.1	PREDICTED: similar to Cniwi	<i>Hydra magnipapillata</i>	2E-93	0.73	0.51	x		x x

Table 3 List of immune genes identified in the libraries. (Continued)

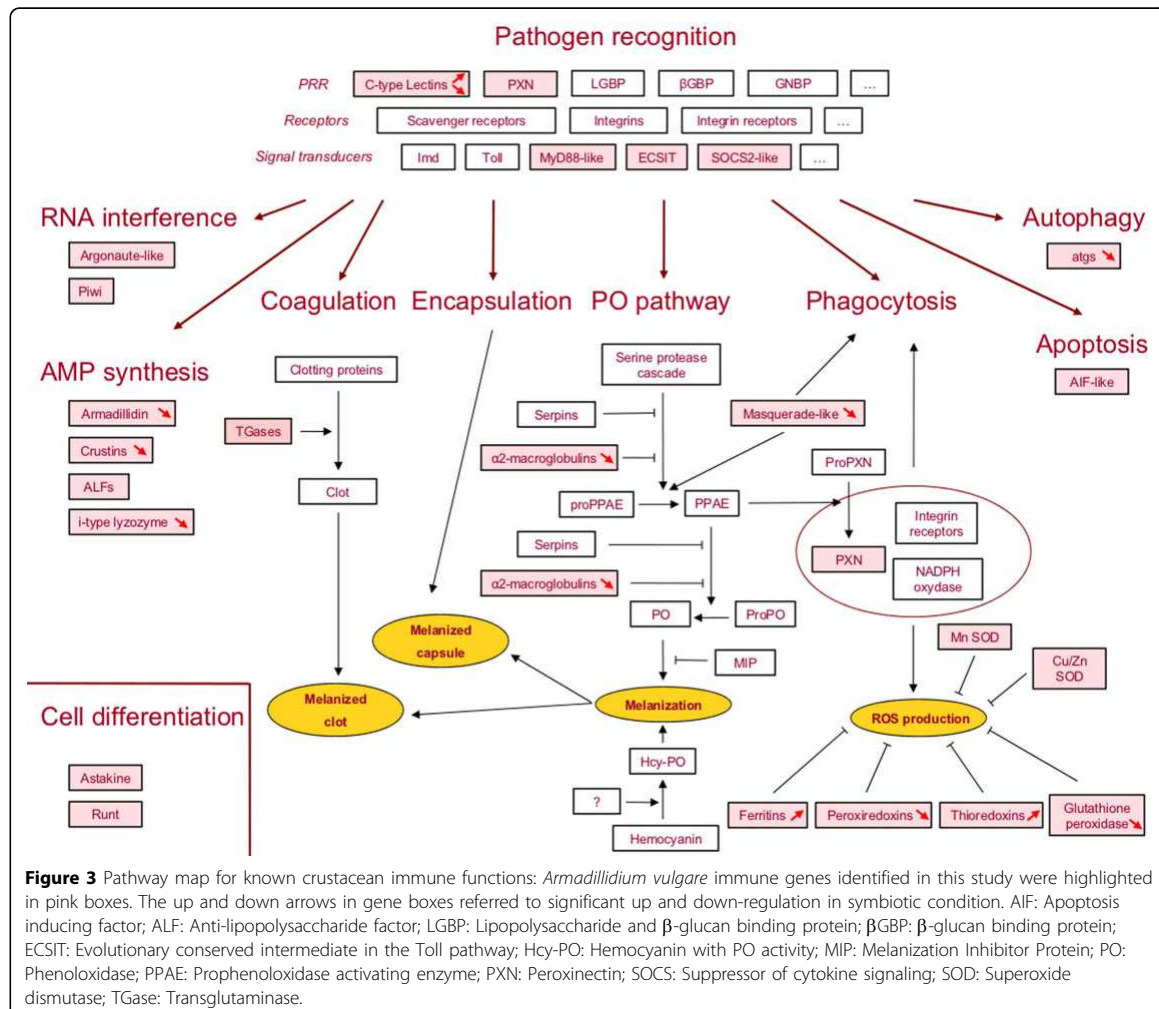
Stress response	Argonaute-like	tblastx	XM_002155877.1	PREDICTED: similar to Cniwi (LOC100201838)	<i>Hydra magnipapillata</i>	4E-105	0.73	0.64						
		blastx	NP_001181904.1	argonaute-2	<i>Sus scrofa</i>	6E-55	0.97	0.50		x				
		tblastx	XM_001638444.1	predicted protein (NEMVEDRAFT_v1g180719)	<i>Nematostella vectensis</i>	3E-56	0.84	0.47						
	Ferritin A	blastx	ABY75225.1	Ferritin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	4E-67	0.47	0.74	x			x	x	x
		tblastx	EU371046.1	Ferritin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	4E-80	0.48	0.75						
	Ferritin B	blastx	ABY75225.1	Ferritin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	2E-50	0.66	0.57					x	x
		tblastx	EU371046.1	Ferritin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	2E-59	0.77	0.58						
	Ferritin C	blastx	ABY75225.1	Ferritin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	3E-58	0.72	0.69						x
		tblastx	EU371046.1	Ferritin	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	4E-68	0.74	0.80						
	Detoxification	BIP2	blastx	XP_001687763.1	AGAP000189-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	<i>Anopheles gambiae</i>	7E-52	0.60	0.46				x	x
tblastx			XM_002428865.1	conserved hypothetical protein	<i>Pediculus humanus</i>	1E-59	0.51	0.57						
Peroxiredoxin A		blastx	ACS91344.1	Peroxiredoxin	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	3E-56	0.81	0.56				x		x
		tblastx	GQ161914.1	Peroxiredoxin	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	1E-117	0.82	0.85						
Peroxiredoxin B		blastx	ACF35639.1	Peroxiredoxin 6	<i>Eriocheir sinensis</i>	1E-79	0.68	0.63				x		x
		tblastx	EU626070.1	Peroxiredoxin 6		4E-95	0.68	0.65						
Peroxiredoxin C		blastx	AAP93584.1	thioredoxin peroxidase	<i>Apis mellifera ligustica</i>	8E-78	0.76	0.78					x	
		tblastx	NM_001030437.1	Peroxiredoxin	<i>Xenopus tropicalis</i>	4E-92	0.77	0.76						
Peroxiredoxin-like D		blastx	XP_970660.2	PREDICTED: similar to 1-Cys peroxiredoxin	<i>Tribolium castaneum</i>	5E-07	0.51	0.70				x		
		tblastx	XM_965567.2	PREDICTED: similar to 1-Cys peroxiredoxin	<i>Tribolium castaneum</i>	1E-09	0.59	0.66						
	Thioredoxin A	blastx	XP_001608075.1	Thioredoxin-like protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	2E-73	0.88	0.60				x		x
		tblastx	XM_001608025.1	Thioredoxin-like protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	2E-84	0.88	0.64						
	Thioredoxin B	blastx	XP_973267.1	PREDICTED similar to Thioredoxin domain-containing protein 14 homolog (LOC662051)	<i>Tribolium castaneum</i>	4E-58	0.96	0.53				x		x
		tblastx	XM_968174.1	PREDICTED similar to Thioredoxin domain-containing protein 14 homolog (LOC662051)	<i>Tribolium castaneum</i>	3E-63	0.91	0.60						

Table 3 List of immune genes identified in the libraries. (Continued)

				Glutathione peroxidase	blastx	AAV66814.1	selenium dependent salivary glutathione peroxidase	<i>Ixodes scapularis</i>	3E-39	0.95	0.43				x
					tblastx	EU399681.1	Glutathione peroxidase	<i>Metapenaeus ensis</i>	5E-36	0.71	0.57				
				Cu/Zn SOD	blastx	ABU55006.1	Copper/zinc superoxide dismutase	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	1E-30	0.43	0.47	x			x
					tblastx	EU077527.1	Copper/zinc superoxide dismutase	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	9E-32	0.31	0.71				
				cytMnSOD	blastx	CAR85669.1	cytoplasmic manganese superoxide dismutase	<i>Cyanagraea praedator</i>	2E-102	0.68	0.66	x		x	x
					tblastx	FM242568.1	cytoplasmic manganese superoxide dismutase	<i>Cyanagraea praedator</i>	8E-116	0.68	0.73				
				Transglutaminase B	blastx	AAK69205.1	Transglutaminase	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	3E-70	0.78	0.54	x			x
					tblastx	AF336805.1	Transglutaminase	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	8E-84	0.78	0.60				
				Astakine	blastx	ACI02322.1	astakine variant 2	<i>Penaeus monodon</i>	3E-11	0.64	0.52				x
					tblastx	EU980445.1	astakine variant 2	<i>Penaeus monodon</i>	7E-15	0.72	0.49				
				Runt	blastx	CAD44571.1	runt protein 1b	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	2E-45	0.67	0.65			x	
					tblastx	AJ506096.1	Pacifastacus leniusculus mRNA for runt protein	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	8E-73	0.65	0.82				
				AIF-like	blastx	NP_001121885.1	apoptosis-inducing factor	<i>Danio rerio</i>	7E-28	0.54	0.43				x
					tblastx	NM_001128413.1	apoptosis-inducing factor	<i>Danio rerio</i>	9E-30	0.52	0.49				
				ATG7	blastx	XP_002600056.1	hypothetical protein BRAFLDRAFT_79689	<i>Branchiostoma floridae</i>	2E-40	0.88	0.52		x		
					tblastx	NM_001129922.1	ATG7 autophagy related 7 homolog	<i>Xenopus tropicalis</i>	5E-40	0.68	0.61				
				ATG12	blastx	ADO32996.1	Autophagy-like protein ATG12	<i>Biston betularia</i>	3E-33	0.50	0.52		x		
					tblastx	HM449861.1	Autophagy-like protein ATG12	<i>Biston betularia</i>	1E-38	0.47	0.53				
				Kinesin	blastx	NP_999817.1	kinesin II	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	3E-159	0.81	0.83		x		x
					tblastx	NM_214652.1	kinesin II	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	0.0	0.82	84.00				

Table 4 Expression of the candidate genes involved in the *A. vulgare* immune response. Transcripts of genes were quantified by RT-qPCR and normalized with the expression of the L8 ribosomal protein (RbL8) and the Elongation Factor 2 (EF2). The ratio of expression between symbiotic and asymbiotic conditions was calculated for each sample (F=whole females; Ov=ovaries; IT=immune tissues, see text). Over-expression and under-expression in symbiotic samples were highlighted in light grey and in dark grey respectively (* p<0.05; ** p<0.001; - no measurable response).

		ratio symbiotic /asymbiotic				
	Biological functions	Genes	F	Ov	IT	
Pathogen Detection	Recognition	C-type lectin 1	1.19	3.42**	1.55	
		C-type lectin 2	0.90	0.30**	-	
		C-type lectin 3	0.47*	-	1.06	
		Peroxinectin-like A	0.93	0.09	2.03	
		Peroxinectin-like B	0.72	0.93	2.03	
	Transduction	ECSIT	1.44	0.63	1.48	
		MyD88-like	0.86	0.78	1.45	
		SOCS2-like	-	0.72	1.44	
Immune response	AMP	ALF 1	0.77	0.57	0.68	
		ALF 2	0.90	2.50	1.42	
		Armadillidine	0.44**	0.83	0.95	
	Crustin	Crustin 1	0.57	-	-	
		Crustin 2	0.77	0.48	-	
		Crustin 3	0.50**	0.47**	-	
		i-type lysozyme	0.63**	0.44	1.77	
		Serine proteases	Masquerade-like A	0.41	1.30	1.18
			Masquerade-like B	0.36*	0.33	-
	Serine protease inhibitors	α_2 -macroglobulin A	0.95	1.03	1.05	
		α_2 -macroglobulin B	0.80	0.83	1.21	
		α_2 -macroglobulin C	0.68	0.32**	0.74	
		α_2 -macroglobulin D	0.56	1.88	1.47	
		α_2 -macroglobulin E	1.44	1.68	3.05	
	Regulation of granular secretion	Cyclophilin G	0.94	0.74	1.31	
	RNAi	Piwi	0.95	0.74	-	
		Argonaute-like	0.98	0.62	1.31	
	Stress response/Detoxification	Ferritin A	0.95	2.32*	1.71	
		Ferritin B	0.79	0.67	-	
		Ferritin C	0.84	1.90**	1.65	
		BIP2	0.86	0.57	1.23	
		Peroxiredoxin A	0.45	0.39	1.59	
		Peroxiredoxin B	0.58	0.44**	1.05	
		Peroxiredoxin C	-	0.02**	-	
		Peroxiredoxin-like D	0.71	1.16	0.53	
		Thioredoxin A	1.59	1.91**	2.13	
		Thioredoxin B	0.57	1.17	0.73	
		Glutathione peroxidase	0.82	0.17**	1.09	
		Cu/Zn SOD	0.45	0.68	1.12	
		cytMn SOD	0.65	0.77	1.66	
	Coagulation	Transglutaminase A	0.75	2.67	1.95	
		Transglutaminase B	1.33	1.99	1.77	
	Cellular differentiation	Astakine	0.98	0.49	2.08	
		Runt	1.40	0.83	1.69	
	Apoptosis	Alf-like	-	0.59	-	
	Autophagy	atg7	0.73	0.53**	0.59	
		atg12	0.92	0.27*	0.69	
	Other	Cytoskeleton	Kinesin	0.94	0.34	1.35
				S > A		S < A



hepatopancreas [58]. Thus, our result represents the eighth largest sequencing effort for any crustacean, behind the cladoceran *Da. pulex* and the decapods *Litopenaeus vannamei* and *Petrolisthes cinctipes*, and the sixth EST data set for any Malacostraca species [51,57]. Few *A. vulgare* unigenes present similarities with crustacean ESTs. This could be in part explained by the phylogenetic distance between isopods and the crustaceans from which EST libraries or genomics data are available. However, the overlapping between libraries was low, suggesting that the sequencing effort should be increased.

The present work allowed us to identify the first immune gene repertoire from a terrestrial crustacean. Indeed, until now large scale characterizations of immune genes in crustaceans have been based on only a few model organisms, such as shrimps, crayfishes or

crabs. All immune genes identified in *A. vulgare* are involved in canonical immune pathways (Table 4 and Figure 3): i) **pathogen detection** including recognition molecules such as the lectins and peroxinectins (PXN) that are able to distinguish between self and non-self particles and signal transducers; ii) **immune cellular responses** including opsonization molecules (e.g., PXN and masquerade-like proteins) inducing phagocytosis and cellular encapsulation; iii) **immune humoral responses** involving clotting and coagulation reactions, production of AMPs, generation of reactive oxygen species, detoxification processes, and the proPhenoloxidase (proPO) cascade; and iv) **other pathways** connected to immune responses such as antiviral immunity (RNA interference), programmed cell death (apoptosis and autophagy), and cell differentiation such as hematopoiesis [49,50,59,60].

Although 40 new genes all involved in immune pathways have been identified, several key genes were lacking (Figure 3). This can be explained by three non-exclusive hypotheses: The relatively low depth of the sequencing effort, the weak annotation (44%) due to divergence between isopods and the other Arthropoda clades, and the absence of some immune genes in isopods. For example, genes encoding important innate immune receptors, such as GNBP or Toll, and their signal transducers Imd, Dorsal, Cactus, Relish were known in different crustacean species [47,49,61,62] but were not identified in *A. vulgare*. PO activity is detected in crustaceans, but isopods such as chelicerates seem to lack PO enzyme and the corresponding gene [11,58,63,64]. In the same way, the PGRP genes have never been identified in crustacean EST libraries nor in the brine shrimp genome [47], which suggests that these genes could be absent in this clade.

A growing number of studies showed that the immune system of *Wolbachia*-infected animals is modulated at the molecular level [17,18,22]. In *A. vulgare*, it has recently been shown that *Wolbachia* impact immune cellular processes [10,11,65]. We show here that *Wolbachia* symbiosis leads to a down-regulation of some *A. vulgare* immune genes. Indeed, among the candidate genes tested, 72% are down-regulated in whole females, 75% in ovaries and 19% in immune tissues. Among the 46 genes analyzed, no significant differential expression was detected in the immune tissues, whereas the expression of 16 of them was significantly disturbed when *Wolbachia* were present in whole animals and ovaries. The impacted genes are involved in biological functions such as stress response and detoxification, autophagy, AMP synthesis, pathogen recognition, and proteolytic cascades.

Several impacted genes are involved in oxidative stress response. The production of reactive oxygen species (ROS) is one of the first lines of defence against invading microbes. High concentrations of ROS create oxidative stresses, resulting in damage to lipids, nucleic acids, and proteins and reducing life span so that complex antioxidant defence systems have evolved to minimize damaging ROS. Our study shows a down-regulation of antioxidant enzymes only in the ovaries. This result agrees with those obtained in *Drosophila* S2 cell line infected by *Wolbachia* [66] and in *A. tabida* - *Wolbachia* symbiosis [24] but not with those from the *Ae. albopictus* Aa23 cell line [22]. In parallel, we show an up-regulation of the thioredoxin gene that could be a response to down-regulation of other genes encoding antioxidant proteins. An alternative hypothesis is that this last gene could be induced by *Wolbachia* to reduce apoptosis and accelerate multiplication of gonadic cells. Indeed, in mice, this electron donor protein reduces the

process of oxidant molecules but also increases cell proliferation and the inhibition of apoptosis [67].

There was a significant over-expression of Ferritins A and C in symbiotic ovaries. Ferritins are important iron sequestration proteins and play a crucial role in the iron-withholding defence system [68]. The up-regulation of ferritin genes could be an active cellular reaction for starving *Wolbachia* of iron, which would lead to bacterial growth limitation. Besides, this over-expression could be the result of the under-expression of the detoxification enzymes (Peroxiredoxin B and C and Glutathione peroxidase). As intracellular free iron produces ROS by the Fenton reaction in presence of H_2O_2 , iron sequestration could reduce ROS production and thus avoid deleterious effects in the cell. Regardless, this result contrasts with that obtained in *A. tabida*-*Wolbachia* system [24,69] where the ferritin genes were under-expressed in symbiotic condition. This down-regulation could be due to the dependence phenotype of *A. tabida* - *Wolbachia* association for the oocyte maturation, whereas our model is a facultative *Wolbachia* symbiosis that is not involved in host oogenesis.

Autophagy was initially reported as a bulk self-degradation mechanism for the turnover of proteins and organelles. Autophagy can be induced via PGRP-LE, which is essential in the innate bacterial recognition in *Drosophila* resistance against *Listeria monocytogenes* [70] suggesting that this biological process is involved in the innate immune response against intracellular bacteria, viruses, and parasites [70,71]. In our study, the *atg7* and *atg12* genes involved in autophagy were down-regulated in ovaries. Autophagy-associated genes were down-regulated also in *A. tabida*-*Wolbachia* and *S. oryzae*-SPE symbioses [24,25], which suggests that this process is critical in bacterial symbiosis. We may hypothesize that this down-regulation was an active strategy of *Wolbachia* to reduce their elimination by their host.

In *Wolbachia*-infected whole animals, three AMP genes were under-expressed (i.e., armadillidin, crustin 3, and i-type lysozyme). Armadillidin and crustin are two Gram-positive AMPs [44,72]. The impact of *Wolbachia* on AMP gene expression varies according to the host-symbiont association. In infected *D. simulans* and *Ae. albopictus* [73], and in the silkworm cell line [74], *Wolbachia* did not disturb AMP expression. On the contrary, attacin and dipterin genes were down-regulated in an infected *D. melanogaster* S2 cell line [66], whereas many AMP genes were up-regulated in the mosquitoes *Ae. aegypti* and *An. gambiae* transfected by the wMel-Pop strain [17-19]. In the *A. tabida*-*Wolbachia* association, the defensin, lysozyme and hymenoptaecin genes were under-expressed [24] as well as the coleoptericin 1 gene in *S. oryzae*-SPE symbiosis [25,75]. In *A. vulgare*,

the down-regulation of AMP genes could be related to the higher septicaemia found in *Wolbachia*-infected animals [10,11].

Two recognition molecules, the C-type lectins 1 and 2, were up and down-regulated, respectively, whereas gene expression of the C-type lectin 3 was not detected in ovaries. The C-type lectins are mainly carbohydrate binding proteins involved in pathogen recognition, opsonization and encapsulation response, and antiviral response [76,77]. It has been shown that these proteins are also involved in symbiont interactions: C-type lectins were required for the symbiont acquisition in scleractinian corals [78,79] and the marine nematode *Laxus oneistus* [80]. In *Ae. aegypti* and *An. gambiae* transfected with the pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop, the C-type lectin genes were up-regulated [17,18]. In *A. vulgare*, expression of the three C-type lectin genes presents different patterns, probably due to specific functions of each protein.

Unlike what was observed in ovaries, the C-type lectin 3 gene expression was significantly down-regulated in immune tissues of symbiotic females, which could impact pathogen recognition ability of the host. In the same way, the serine protease masquerade-like B gene was down-regulated. This protein family is involved in several biological functions such as pattern recognition, opsonization, cell adhesion activity [81], and in antiviral responses [82]. In our system, the under-expression of this masquerade-like gene could potentially impair these functions.

In symbiotic ovaries, one kinesin-related gene was down-regulated. This pattern observed by RT-qPCR was also confirmed by *in silico* comparison between SSH-A vs. SO libraries. Indeed GO analysis highlighted vesicle transport and microtubule motor activity as the only functions over-represented in asymbiotic ovaries. These functions were mainly associated with kinesin protein family. In *D. melanogaster*, kinesin-1 has been reported to be involved in wMel *Wolbachia* transport toward the posterior part of the oocyte [83]. In *A. vulgare*, the relation between kinesin and *Wolbachia* is still unknown. Nevertheless, the down-regulation observed in symbiotic ovaries might be a host response for limiting the movement of *Wolbachia* in oocytes. In the weevil *S. oryzae*, the primary endosymbiont SPE seems to stimulate vesicle trafficking, which emphasizes the importance of this process in host-symbiont interactions [25].

Conclusion

Our study represents the first transcriptomics approach that aims at deciphering the *A. vulgare*-*Wolbachia* interactions and it established the first reference transcriptome for isopods. In *A. vulgare*, *Wolbachia* colonize not only

the ovaries but also other tissues, particularly the immune cells [65,84]. Therefore, perturbation of the host immune gene expression could be a direct effect of the bacteria on immunity. In such a scenario, *Wolbachia* would not be a silent bacterium and could counteract the host immune system to survive and establish a long term association with the host. The quantification of immune-related gene expression revealed a global trend to gene under-expression in *Wolbachia*-infected whole animals and ovaries. Unexpected modulation of immune gene expression in ovaries could reflect a *Wolbachia* strategy to manipulate the crucial tissue for vertical transmission. Surprisingly, most of the immune genes (30/37) tend to be up-regulated in immune tissues. This general up-regulation could compensate the immune depressive effect of *Wolbachia* previously described in *A. vulgare* [10,11,65]. These results conflict with those observed in insect cell lines where *Wolbachia* down-regulated immune-related genes [66,85] but are congruent with those obtained in transfected wMelPop mosquitoes [17-19]. More work needs to be done to check whether this up-regulation confers host pathogen protection as observed in *Drosophila* and mosquitoes [14,15,17,19].

Additional material

Additional file 1: Primer pairs used for RT-qPCR quantification.

Additional file 2: Unigenes differentially represented between symbiotic and asymbiotic ovaries.

Additional file 3: Processes and functions over-represented in *A. vulgare* ovaries in response to *Wolbachia* infection, biological process levels 4 and 6.

Additional file 4: Immune unigenes present in SO, AO, SSH-S, SSH-A, SSH-C, and SSH-NC libraries.

Additional file 5: Expression profiles of genes studied in whole animals, ovaries, and immune tissues of *A. vulgare*. Gene transcripts were quantified by RT-qPCR and normalized with the expression of the ribosomal protein (RbL8) and the Elongation Factor 2 (EF2). Each bar represents the mean of three independent measurements with standard error.

Acknowledgements and funding

We thank Catherine Debenest, Carine Delaunay, Jérôme Lesobre and Maryline Raimond for technical assistance and Renaud Fortuner for improving the English. *A. vulgare* sequences were obtained in the frame of the program "Functional Genomics and Immune Signaling in Invertebrate Endosymbiosis" in collaboration with the Centre National de Séquençage, Genoscope (Evry, France). This research was funded by the CNRS UMR 6556, the Université de Poitiers and the Agence Nationale de la Recherche ("EndoSymbArt" ANR-06-BLAN-0316 and "ImmunSymbArt" ANR-2010-BLAN-170101, both coordinated by DB). This article has been published as part of *BMC Microbiology* Volume 11 Supplement 1, 2012: Arthropod symbioses: from fundamental studies to pest and disease management. The full contents of the supplement are available online at <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12?issue=S1>.

Author details

¹Université de Poitiers, Laboratoire Écologie, Évolution, Symbiose, UMR CNRS 6556, 40 avenue du recteur Pineau, F-86022 Poitiers cedex, France.

²Université de Lyon 1, Laboratoire de Biométrie et de Biologie Évolutive, UMR CNRS 5558, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, France. ³Parasitologie Fonctionnelle et Évolutive, UMR CNRS 5244, Université de Perpignan, 52 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan cedex, France. ⁴Génoscope, UMR CNRS 8030, Centre National de Séquençage, Evry, France.

Authors' contributions

FC performed the RT-qPCR experiments and analysis, the bioinformatics analysis, and drafted the manuscript. JHG participated in the design of experiments, prepared the libraries, and participated in the sequence analysis. DC participated in the design of experiments, carried out the EST data processing and analysis, and helped for statistical analysis of expression data. GM helped to design RT-qPCR experiments and reviewed the manuscript. FG and PW sequenced the libraries. PG, CBV and DB conceived and coordinated the study, participated in its design, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Published: 18 January 2012

References

- Werren JH, Baldo L, Clark ME: *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**:741-751.
- Bouchon D, Cordaux R, Grève P: *Feminizing Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In *Insect symbiosis. Volume 3*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group;Bourtzis K, Miller TA 2008:273-294.
- Cordaux R, Bouchon D, Grève P: *The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms*. *Trends Genet* 2011, **27**:332-341.
- Negri I, Pellicchia M, Grève P, Daffonchio D, Bandi C, Alma A: *Sex and stripping: the key to the intimate relationship between Wolbachia and host?* *Commun Integr Biol* 2010, **3**:110-115.
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D: *Evidence for a new feminizing Wolbachia strain in the isopod Armadillidium vulgare: evolutionary implications*. *Heredity* 2004, **93**:78-84.
- Lachat M: *Impact de deux souches de Wolbachia sur les traits d'histoire de vie de leurs hôtes Armadillidium vulgare*. PhD thesis Université de Poitiers, Ecole doctorale ICBG; 2009.
- Moreau J, Bertin A, Caubet Y, Rigaud T: *Sexual selection in an isopod with Wolbachia-induced sex reversal: males prefer real females*. *J Evol Biol* 2001, **14**:388-394.
- Rigaud T, Moreau J: *A cost of Wolbachia-induced sex reversal and female-biased sex ratios: decrease in female fertility after sperm depletion in a terrestrial isopod*. *Proc Biol Sci* 2004, **271**:1941-1946.
- Lachat M, Caubet Y, Bouchon D: *Does Wolbachia influence survival in starved Armadillidium vulgare?* In *Proceedings of the International Symposium of Terrestrial Isopod Biology ISTIB 07; Tunis*. Shaker Verlag;Zimmer M, Charfi-Cheikhrouha F, Taiti S 2008:125-130.
- Braquart-Varnier C, Lachat M, Herbinière J, Johnson M, Caubet Y, Bouchon D, Sicard M: *Wolbachia mediate variation of host immunocompetence*. *PLoS ONE* 2008, **3**:e3286.
- Sicard M, Chevalier F, De Vlehouwer M, Bouchon D, Grève P, Braquart-Varnier C: *Variations of immune parameters in terrestrial isopods: a matter of gender, aging and Wolbachia*. *Naturwissenschaften* 2010, **97**:819-826.
- Cook PE, McGraw EA: *Wolbachia pipiensis: an expanding bag of tricks to explore for disease control*. *Trends Parasitol* 2010, **26**:373-375.
- Fytro A, Schofield PG, Kraaijeveld AR, Hubbard SF: *Wolbachia infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence*. *Proc Biol Sci* 2006, **273**:791-796.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN: *Wolbachia and virus protection in insects*. *Science* 2008, **322**:702.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M: *The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 2008, **6**:e2.
- Osborne SE, Leong YS, O'Neill SL, Johnson KN: *Variation in antiviral protection mediated by different Wolbachia strains in Drosophila simulans*. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000656.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL: *A Wolbachia symbiont in Aedes aegypti limits infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium*. *Cell* 2009, **139**:1268-1278.
- Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MSC, Godfray HJ, Sinden RE, Sinkins SP: *Wolbachia stimulates immune gene expression and inhibits Plasmodium development in Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1001143.
- Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z: *The endosymbiotic bacterium Wolbachia induces resistance to Dengue virus in Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1000833.
- Saridaki A, Bourtzis K: *Wolbachia: more than just a bug in insects genitals*. *Curr Opin Microbiol* 2010, **13**:67-72.
- Walker T, Moreira LA: *Can Wolbachia be used to control malaria?* *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**(Suppl 1):212-217.
- Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR, Harris HL: *The endosymbiont Wolbachia pipiensis induces the expression of host antioxidant proteins in an Aedes albopictus cell line*. *PLoS ONE* 2008, **3**:e2083.
- Molina-Cruz A, DeJong RJ, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C: *Reactive oxygen species modulate Anopheles gambiae immunity against bacteria and Plasmodium*. *J Biol Chem* 2008, **283**:3217-3223.
- Kremer N, Charif D, Henri H, Gavory F, Wincker P, Mavingui P, Vavre F: *Influence of Wolbachia on host gene expression in an obligatory symbiosis*. *BMC Microbiol* 2012, **12**(Suppl 1):S7.
- Vigneron A, Charif D, Vallier A, Vincent-Monegat C, Gavory F, Wincker P, Heddi A: *Host response to endosymbiont and pathogen in the cereal weevil Sitophilus oryzae*. *BMC Microbiol* 2012, **12**(Suppl 1):S14.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P: *Evidence for widespread Wolbachia infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization*. *Proc Biol Sci* 1998, **265**:1081-1090.
- Matz MV: *Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes*. *Methods Mol Biol* 2002, **183**:3-18.
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD: *Reverse transcriptase template switching: a smart approach for full-length cDNA library construction*. *Biotechniques* 2001, **30**:892-897.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD: *Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:6025-6030.
- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD: *Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes*. *Methods Enzymol* 1999, **303**:349-380.
- Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA: *Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization*. *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:E90.
- Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekova GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA: *Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease*. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:e37.
- Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Staroverov DB, Rasskazov VA, Lukyanov S: *A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas*. *Genome Res* 2002, **12**:1935-1942.
- Ewing B, Green P: *Base-calling of automated sequencer traces using Phred. ii. error probabilities*. *Genome Res* 1998, **8**:186-194.
- Pertea G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, Karamycheva S, Lee Y, White J, Cheung F, Parvizi B, Tsai J, Quackenbush J: *Tigr gene indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets*. *Bioinformatics* 2003, **19**:651-652.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M: *BLAST2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research*. *Bioinformatics* 2005, **21**:3674-3676.
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A: *High-throughput functional annotation and data mining with the BLAST2GO suite*. *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:3420-3435.

38. Stekel DJ, Git Y, Falciani F: **The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries.** *Genome Res* 2000, **10**:2055-2061.
39. Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J: **FatiGO: a web tool for finding significant associations of gene ontology terms with groups of genes.** *Bioinformatics* 2004, **20**:578-580.
40. Marshall OJ: **PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR.** *Bioinformatics* 2004, **20**:2471-2472.
41. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e45.
42. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: **Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:e36.
43. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH: **CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:D225-9.
44. Herbinère J, Braquart-Varnier C, Grève P, Strub J, Frère J, Van Dorsselaer A, Martin G: **Armadiillin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (terrestrial isopod, crustacean).** *Dev Comp Immunol* 2005, **29**:489-499.
45. Herbinère J, Grève P, Strub J, Thiersé D, Raimond M, van Dorsselaer A, Martin G, Braquart-Varnier C: **Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*.** *Dev Comp Immunol* 2008, **32**:875-882.
46. Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K: **Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization.** *Immunobiology* 2006, **211**:213-236.
47. McTaggart SJ, Conlon C, Colbourne JK, Blaxter ML, Little TJ: **The components of the *Daphnia pulex* immune system as revealed by complete genome sequencing.** *BMC Genomics* 2009, **10**:175.
48. Ghosh J, Lun CM, Majeske AJ, Sacchi S, Schrankel CS, Smith LC: **Invertebrate immune diversity.** *Dev Comp Immunol* 2010, **35**:959-974.
49. Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, Agundis C, Pereyra-Morales A, Zenteno E: **Immunity mechanisms in crustaceans.** *Innate Immunol* 2009, **15**:179-188.
50. Liu H, Wu C, Matsuda Y, Kawabata S, Lee BL, Söderhäll K, Söderhäll I: **Peptidoglycan activation of the proPO-system without a peptidoglycan receptor protein (PGRP)?** *Dev Comp Immunol* 2011, **35**:51-61.
51. Stillman JH, Colbourne JK, Lee CE, Patel NH, Phillips MR, Towle DW, Eads BD, Gelembiuk GW, Henry RP, Johnson EA, Pfrender ME, Terwilliger NB: **Recent advances in crustacean genomics.** *Integr Comp Biol* 2008, **48**:852-868.
52. Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, Oakley TH, Tokishita S, Aerts A, Arnold GJ, Basu MK, Bauer DJ, Cáceres CE, Carmel L, Casola C, Choi J, Detter JC, Dong Q, Dusheyko S, Eads BD, Fröhlich T, Geiler-Samerotte KA, Gerlach D, Hatcher P, Jogdeo S, Krijgsvelde J, Kriventseva EV, Kültz D, Laforché C, Lindquist E, Lopez J, Manak JR, Muller J, Pangilinan J, Patwardhan RP, Pitluck S, Pritham EJ, Rechtsteiner A, Rho M, Rogozin IB, Sakarya O, Salamov A, Schaack S, Shapiro H, Shiga Y, Skalitzyk C, Smith Z, Souvorov A, Sung W, Tang Z, Tsuchiya D, Tu H, Vos H, Wang M, Wolf YI, Yamagata H, Yamada T, Ye Y, Shaw JR, Andrews J, Crease TJ, Tang H, Lucas SM, Robertson HM, Bork P, Koonin EV, Zdobnov EM, Grigoriev IV, Lynch M, Boore JL: **The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*.** *Science* 2011, **331**:555-561.
53. Jiravanichpaisal P, Puanglarp N, Petkon S, Donnuea S, Söderhäll I, Söderhäll K: **Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*.** *Fish Shellfish Immunol* 2007, **23**:815-824.
54. de Lorgeril J, Saulnier D, Janec MG, Gueguen Y, Bachère E: **Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*.** *Physiol Genomics* 2005, **21**:174-183.
55. Wongsurawat T, Leelatanawit R, Tharnnietdee N, Uawisetwathana U, Karoonuthaisiri N, Menasveta P, Klinbunga S: **Identification of testis-relevant genes using *in silico* analysis from testis ests and cDNA microarray in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).** *BMC Mol Biol* 2010, **11**:55.
56. Gorbach DM, Hu Z, Du Z, Rothschild MF: **Mining ESTs to determine the usefulness of SNPs across shrimp species.** *Anim Biotechnol* 2010, **21**:100-103.
57. Tagmount A, Wang M, Lindquist E, Tanaka Y, Teranishi KS, Sunagawa S, Wong M, Stillman JH: **The porcelain crab transcriptome and pcd, the porcelain crab microarray and sequence database.** *PLoS ONE* 2010, **5**:e9327.
58. King AJ, Cragg SM, Li Y, Dymond J, Guille MJ, Bowles DJ, Bruce NC, Graham IA, McQueen-Mason SJ: **Molecular insight into lignocellulose digestion by a marine isopod in the absence of gut microbes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:5345-5350.
59. Söderhäll I, Bangyeekhun E, Mayo S, Söderhäll K: **Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*.** *Dev Comp Immunol* 2003, **27**:661-672.
60. Söderhäll I, Kim Y, Jiravanichpaisal P, Lee S, Söderhäll K: **An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis.** *J Immunol* 2005, **174**:6153-6160.
61. Wang P, Gu Z, Huang X, Liu B, Deng X, Ai H, Wang J, Yin Z, Weng S, Yu X, He J: **An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes.** *Mol Immunol* 2009, **46**:1897-1904.
62. Zheng L, Hou L, Chang AK, Yu M, Ma J, Li X, Zou X: **Expression pattern of a gram-negative bacteria-binding protein in early embryonic development of *Artemia sinica* and after bacterial challenge.** *Dev Comp Immunol* 2011, **35**:35-43.
63. Jaenicke E, Fraune S, May S, Irmak P, Augustin R, Meesters C, Decker H, Zimmer M: **Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice?** *Dev Comp Immunol* 2009, **33**:1055-1063.
64. Pless DD, Aguilar MB, Falcón A, Lozano-Alvarez E, Heimer de la Cotera EP: **Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean.** *Arch Biochem Biophys* 2003, **409**:402-410.
65. Chevalier F, Herbinère-Gaboreau J, Bertaux J, Raimond M, Morel F, Bouchon D, Grève P, Braquart-Varnier C: **The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*: meeting with their invaders, *Wolbachia*.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e18531.
66. Xi Z, Gavotte L, Xie Y, Dobson SL: **Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host.** *BMC Genomics* 2008, **9**:1.
67. Yoshida T, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J: **The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1055**:1-12.
68. Ong ST, Ho JZS, Ho B, Ding JL: **Iron-withholding strategy in innate immunity.** *Immunobiology* 2006, **211**:295-314.
69. Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F: ***Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000630.
70. Yano T, Kurata S: **Induction of autophagy via innate bacterial recognition.** *Autophagy* 2008, **4**:958-960.
71. Virgin HW, Levine B: **Autophagy genes in immunity.** *Nat Immunol* 2009, **10**:461-470.
72. Smith VJ, Fernandes JMO, Kemp GD, Hauton C: **Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans.** *Dev Comp Immunol* 2008, **32**:758-772.
73. Bourtzis K, Pettigrew MM, O'Neill SL: ***Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides.** *Insect Mol Biol* 2000, **9**:635-639.
74. Nakamura Y, Gotoh T, Imanishi S, Mita K, Kurtti TJ, Noda H: **Differentially expressed genes in silkworm cell cultures in response to infection by *Wolbachia* and *Cardinium* endosymbionts.** *Insect Mol Biol* 2011, **20**:279-289.
75. Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monégat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, Rochat D, Heddi A: **Anti-microbial peptides keep insect endosymbionts under control.** *Science* .
76. Zelensky AN, Gready JE: **The C-type lectin-like domain superfamily.** *FEBS J* 2005, **272**:6179-6217.
77. Ao J, Ling E, Yu X: ***Drosophila* C-type lectins enhance cellular encapsulation.** *Mol Immunol* 2007, **44**:2541-2548.

78. Kvennefors ECE, Leggat W, Hoegh-Guldberg O, Degnan BM, Barnes AC: **An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts.** *Dev Comp Immunol* 2008, **32**:1582-1592.
79. Vidal-Dupiol J, Adjroul M, Roger E, Foure L, Duval D, Mone Y, Ferrier-Pages C, Tambutte E, Tambutte S, Zoccola D, Allemand D, Mitta G: **Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms.** *BMC Physiol* 2009, **9**:14.
80. Bulgheresi S, Schabussova I, Chen T, Mullin NP, Maizels RM, Ott JA: **A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor dc-sign mediates symbiont acquisition by a marine nematode.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:2950-2956.
81. Lee SY, Söderhäll K: **Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*.** *J Immunol* 2001, **166**:7319-7326.
82. Sriphajit T, Flegel TW, Senapin S: **Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of Yellow Head Virus.** *Dev Comp Immunol* 2007, **31**:1145-1158.
83. Serbus LR, Sullivan W: **A cellular basis for *Wolbachia* recruitment to the host germline.** *PLoS Pathog* 2007, **3**:e190.
84. Rigaud T, Juchault P: **Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice.** *J Evol Biol* 1995, **8**:249-255.
85. Hughes GL, Ren X, Ramirez JL, Sakamoto JM, Bailey JA, Jedlicka AE, Rasgon JL: ***Wolbachia* infections in *Anopheles gambiae* cells: transcriptomic characterization of a novel host-symbiont interaction.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1001296.

doi:10.1186/1471-2180-12-S1-S1

Cite this article as: Chevalier et al.: Feminizing *Wolbachia*: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiology* 2012 **12**(Suppl 1):S1.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Gene Name	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (pb)
α_2 -macroglobulin A	EU216753.1	ATTGTGGCTCGGGAAC	CTCTGGCTGAGTCTGGA	192
α_2 -macroglobulin B	FQ905899	GTCAGCGAGACTTATACATTACC	GCAGCTAACGCTTCATCA	155
α_2 -macroglobulin C	FQ885631	GATGGGGACGACAATAAAG	ATTCGTTTGGAGGTGGTA	187
α_2 -macroglobulin D	FQ899211	TGCTGTAACAGGCAGT	GTGAACGAGTCCTCCG	262
α_2 -macroglobulin E	FQ893750	GACACTGTAGTCGCCC	TCGTAAGGCACCCTGA	225
AIF-like	FQ898988	ATTCTCCAGTCTCCATCGG	GGCTATTCCAACCACCTTT	241
ALF 1	FQ895095	AGTTTATGGTCCGATGGTGA	GAAGTCCTTCGTGGCCT	186
ALF 2	FQ893962	CAGCCACAGAGACACT	ACTCCAACATTCAGAGGT	186
Armadillidin	AY644458	GGTGGAGGTGGTGGATTCAA	TTTAGATGATTATCCTCTGTAGCCG	150
Argonaute-like	FQ906629	GAAGATTGGAGGCGTGAA	CGATTGATGGGATTGAGGA	142
Astakine	FQ904075	AGAAAATGACTCCGAATCAG	GCTTCAGGTAAATGTATCGTT	200
ATG7	FQ892863	TCCTTCAAATTCTCCACAACA	TCTATCGCGTCCAAATCC	191
ATG12	FQ896457	CTTTGCTCCATCACCAGA	TTCATCCTCGCCTCAAAC	198
BIP2	FQ898092	CATTTCCCTCACAAAGTTCC	CCATTACCCTCTCATCACC	216
Cyclophilin G	EU216759.1	TAAAGGAGAAGGTTACAAGGG	GTTTGCCATTGAAAGCCA	177
Crustin 1	FQ901343	AAAGATCGCCACCAGT	TTTGTACGTCCTGGG	224
Crustin 2	FQ904008	CCAGAGACCTCGACCC	TGATCCCAAATACTACCGATA	208
Crustin 3	FQ899403	AAGCAGTCGATCCATCT	ACGGCGCTTTACAAAC	255
ECSIT	FQ905410	AATGGTTTGCTGCTCTTTC	CCCGCAATAGTCTTTCTTGT	139
Elongation Factor 2	FQ896398	GTCAGATCATCCCAACAACA	TTTCCTCAAATACCACTCCAC	164
Ferritin A	FQ887056	AGAACGTGAACATGCC	CGCAACTGTCTCCCTT	191
Ferritin B	FQ889513	GGGCTTCAGGATATTCTTTCTC	ACTCTAGAAATAATGTGGCCAA	170
Ferritin C	FQ906089	AAGCAAGTAAACCACTCCC	ATAGCCTCAACCTGTTCTTC	117
i-type lysozyme	FQ902565	TCCGTTCTCATCTCGTAT	ACCATCTCCATTACAATCCTG	171
Kinesin1	FQ904911	AATAAGAACAAGCAGAGTCGG	AGATACATCCATTTCAACCACC	104
C-type lectin 1	FQ900396	GGGAGCCTGTTACGAT	GCCATACAAAGCGGAG	205
C-type lectin 2	FQ892973	ATCGGCGGAAACTACA	CCCATCGCTACCTCCA	183
C-type lectin 3	FQ906953	GGCTCACACCTTGCTTATATC	TTCTTACAGGGTAACCATGGCC	143
Masquerade-like A	ABY64694.1	ACACTTTGCGTCACAAC	CCTCCATCACCGTAGC	209
Masquerade-like B	FQ900550	ACATCGTACATGCGAAAC	TCCACCCAGTGACTGAA	255
MyD88-like	FQ906745	TTGTGGATTAGAAAGGAGG	GCTGTCTGTATATCTTCGTCA	181
Glutathione peroxidase	FQ900254	TACTGAGGTATGAGCAACGC	TGGACGGACGTATTTGACT	165
Peroxinectin-like A	FQ893953	TCCCTCGTTGGTCCAC	ACATGGGTAGCATCAGT	182
Peroxinectin-like B	FQ893964	ATTGGACGACACTCGG	AGATGGGCCAAACCAG	225
Peroxiredoxin A	FQ903144	TCTCACCTTGCATGGG	CTGGAACGCTTGTACC	246
Peroxiredoxin B	FQ899986	TCCCTTATCCTGCTACTACC	GAAATTGCTTCTTGCTTCT	167
Peroxiredoxin C	FQ889661	GTCTTGGTGGTCTAGCTTATC	TATGAGAAACAATCCGCGAA	112

Peroxiredoxin-like D	FQ886901	GGGAGGTAACTTTGTTTATACT	CCCATGAATCTCCAAGGAAAT	177
Piwi	FQ899145	ATATGATGATTGGGTATGATGCT	ATCCCTGAACACAACACTACTG	229
SOCS2-like	FQ907205	GTGAGAACAACCTTACCCAAG	TTTCGTGTCAAGTCCTGTC	220
Cu/Zn SOD	FQ893604	AAAGTGTAGCTCGGCG	CCAGCGTTTCCAGTCT	261
Mn SOD	ABY64695.1	AACTGGTGCTATCGCC	ACCCAAGTCACTGGA	181
RbL8	FQ895433	AACTGGAGATAGAGGCAAA	CCACCAGCAGCAATTC	159
Runt	FQ891956	AAGTCGGGGATGGAAC	GGGAGGAGTCGTACTGA	185
Thioredoxin A	FQ899701	CCCAAATTCTGCCCAGTT	TTTCCGATTCATTTAGGCATTC	235
Thioredoxin B	FQ893083	AGACCCTGTTTAGATTCCAAAG	CGAGGTACTTCTCATGTTGTT	123
Transglutaminase A	EU216757	AGGGAGTCTTAGTTGGC	CGGGTCTACAAGGGAT	189
Transglutaminase B	FQ893748	AGACGTTGAACGTGTGC	AGTGTCCGAGACTCTCC	189

Accession number of ESTs corresponding to over-represented unigenes	Rj	Accession number	Description	OS	OA	N	SSH-S	SSH-A	SSH-C	SSH-NC	Description	Length	mean Sim	GOs	Enzyme codes	InterProScan
FQ892049	5,7	NA	NA	0	27	0	0	0	0	3	activin atype iia	664	42.25%	F:transferase activity; F:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity; P:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway; C:integral to membrane; F:protein serine/threonine kinase activity; C:membrane; F:protein kinase activity; F:transforming growth factor beta receptor activity; F:nucleotide binding; P:protein amino acid phosphorylation; F:ATP binding; F:kinase activity; F:receptor activity; F:metal ion binding; F:magnesium ion binding; F:manganese ion binding; F:receptor signaling protein serine/threonine kinase activity	NA	noIPR
FQ887701	2,5	NA	NA	6	0	7	0	0	0	0	---NA---	765			NA	no IPS match
FQ890062	2,1	NA	NA	0	10	8	0	0	0	0	---NA---	873	50.6%		NA	no IPS match
FQ892189	2,1	NA	NA	0	10	0	0	0	0	0	cation-transporting atpase	634	50.0%		NA	noIPR
FQ886179	2,08	B0X7W3 B0X7W3_CULQU	Putative uncharacterized protein - Culex quinquefasciatus (Southern house mosquito)	5	0	1	0	0	0	0	set and mynd domain-containing	1092	50.0%	C:nucleus	NA	noIPR
FQ886823	2,08	Q7ZXG5 Q7ZXG5_XENLA	3081 protein - Xenopus laevis (African clawed frog)	5,00	0,00E+00	0	0	0,00	0,00	0,00E+00	ubiquitinisoform cra_a	725	98.9%		NA	no IPS match

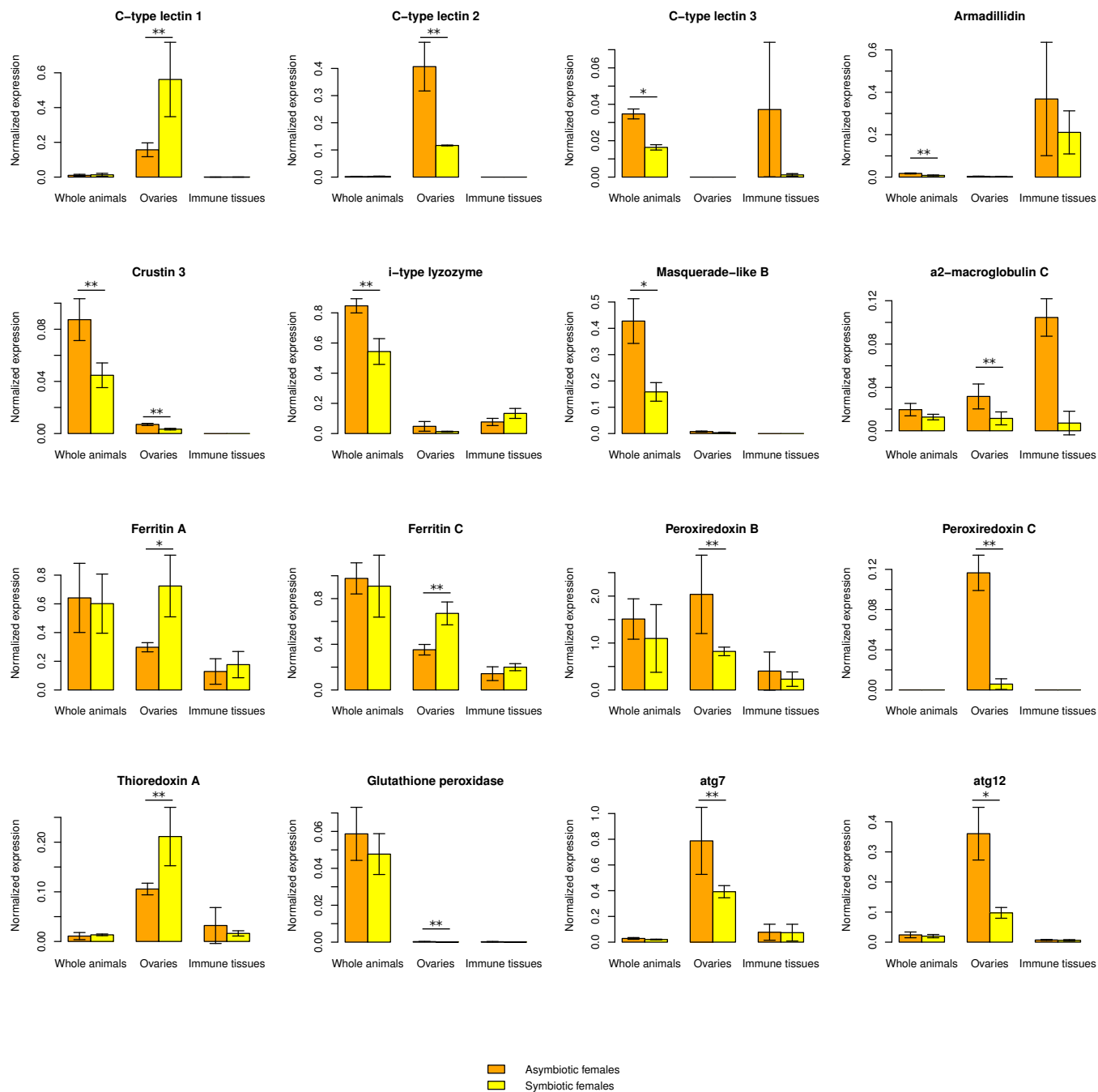
	Biological process	GO accession	A	S	A/S
AO ~ SO	mitotic sister chromatid segregation	GO:0000070	0,05	0,09	0,56
level 4	meiotic spindle organization and biogenesis	GO:0000212	0,02	0,02	1,00
(n= 217)	sister chromatid segregation	GO:0000819	0,05	0,09	0,56
	regulation of action potential	GO:0001508	0,00	0,02	0,00
	response to hypoxia	GO:0001666	0,04	0,05	0,80
	blastocyst development	GO:0001824	0,04	0,07	0,57
	regulation of systemic arterial blood pressure by hormone	GO:0001990	0,11	0,14	0,79
	leukocyte mediated immunity	GO:0002443	0,02	0,02	1,00
	regulation of immune effector process	GO:0002697	0,04	0,14	0,29
	aldehyde metabolic process	GO:0006081	0,07	0,11	0,64
	electron transport	GO:0006118	3,82	6,14	0,62
	vitamin metabolic process	GO:0006766	0,14	0,21	0,67
	oxygen and reactive oxygen species metabolic process	GO:0006800	0,00	0,02	0,00
	smooth muscle contraction	GO:0006939	0,02	0,02	1,00
	humoral immune response	GO:0006959	0,11	0,14	0,79
	mitotic chromosome condensation	GO:0007076	0,02	0,05	0,40
	neurotransmitter secretion	GO:0007269	0,04	0,05	0,80
	spermatid development	GO:0007286	0,07	0,11	0,64
	eggshell chorion formation	GO:0007306	0,04	0,05	0,80
	neuroblast proliferation	GO:0007405	0,02	0,02	1,00
	sex determination	GO:0007530	0,09	0,14	0,64
	blood coagulation	GO:0007596	0,04	0,05	0,80
	hemostasis	GO:0007599	0,04	0,05	0,80
	regulation of heart contraction	GO:0008016	0,00	0,02	0,00
	axon ensheathment	GO:0008366	0,00	0,02	0,00
	response to virus	GO:0009615	0,02	0,02	1,00
	response to toxin	GO:0009636	0,00	0,05	0,00
	alkaloid metabolic process	GO:0009820	0,02	0,02	1,00
	carbon utilization by fixation of carbon dioxide	GO:0015977	0,05	0,09	0,56
	energy derivation by oxidation of organic compounds	GO:0015980	0,41	1,70	0,24
	macroautophagy	GO:0016236	0,02	0,05	0,40
	somatic diversification of immunoglobulins	GO:0016445	0,02	0,02	1,00
	viral genome replication	GO:0019079	0,02	0,02	1,00
	regulation of lipid metabolic process	GO:0019216	0,02	0,02	1,00
	telencephalon development	GO:0021537	0,02	0,02	1,00
	eggshell formation	GO:0030703	0,04	0,05	0,80
	oocyte fate determination	GO:0030716	0,02	0,02	1,00
	hindbrain development	GO:0030902	0,02	0,02	1,00
	reproductive behavior in a multicellular organism	GO:0033057	0,04	0,05	0,80
	regulation of membrane potential	GO:0042391	0,00	0,02	0,00
	response to drug	GO:0042493	0,07	0,09	0,78
	nitrogen compound biosynthetic process	GO:0044271	0,16	0,30	0,53
	innate immune response	GO:0045087	0,02	0,02	1,00
	homologous chromosome segregation	GO:0045143	0,02	0,02	1,00
	germ-line cyst encapsulation	GO:0048138	0,02	0,02	1,00
	vesicle docking	GO:0048278	0,04	0,05	0,80
	positive regulation of response to stimulus	GO:0048584	0,05	0,11	0,45
	regulation of immune response	GO:0050776	0,04	0,14	0,29
	negative regulation of multicellular organismal process	GO:0051241	0,04	0,05	0,80
	regulation of cell motility	GO:0051270	0,00	0,05	0,00
	establishment of chromosome localization	GO:0051303	0,00	0,02	0,00
	metaphase plate congression	GO:0051310	0,00	0,02	0,00

	meiotic metaphase plate congression	GO:0051311	0,00	0,02	0,00
	establishment of vesicle localization	GO:0051650	0,04	0,07	0,57
AO ~ SO	mitochondrial genome maintenance	GO:0000002	0,02	0,02	1,00
level 6	regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	GO:0000079	0,04	0,09	0,44
(n= 220)	G2 phase of mitotic cell cycle	GO:0000085	0,02	0,05	0,40
	sulfur amino acid biosynthetic process	GO:0000097	0,04	0,07	0,57
	sulfate assimilation	GO:0000103	0,02	0,02	1,00
	achiasmate meiosis I	GO:0000705	0,00	0,02	0,00
	long-chain fatty acid metabolic process	GO:0001676	0,02	0,02	1,00
	in utero embryonic development	GO:0001701	0,05	0,07	0,71
	somitogenesis	GO:0001756	0,00	0,02	0,00
	myeloid leukocyte differentiation	GO:0002573	0,00	0,02	0,00
	disaccharide metabolic process	GO:0005984	0,02	0,05	0,40
	chitin metabolic process	GO:0006030	0,00	0,02	0,00
	tricarboxylic acid cycle	GO:0006099	0,09	0,14	0,64
	pyrimidine nucleoside metabolic process	GO:0006213	0,02	0,02	1,00
	DNA fragmentation during apoptosis	GO:0006309	0,04	0,05	0,80
	protein amino acid glycosylation	GO:0006486	0,05	0,16	0,31
	protein amino acid lipidation	GO:0006497	0,02	0,02	1,00
	cysteine metabolic process	GO:0006534	0,02	0,05	0,40
	tryptophan metabolic process	GO:0006568	0,05	0,11	0,45
	indolalkylamine metabolic process	GO:0006586	0,05	0,11	0,45
	triacylglycerol metabolic process	GO:0006641	0,04	0,07	0,57
	phospholipid metabolic process	GO:0006644	0,12	0,18	0,67
	porphyrin biosynthetic process	GO:0006779	0,05	0,07	0,71
	vesicle coating	GO:0006901	0,00	0,05	0,00
	phagocytosis	GO:0006909	0,25	0,34	0,74
	phagocytosis. engulfment	GO:0006911	0,25	0,34	0,74
	mitotic centrosome separation	GO:0007100	0,04	0,05	0,80
	Notch signaling pathway	GO:0007219	0,02	0,02	1,00
	oocyte dorsal/ventral axis determination	GO:0007310	0,04	0,07	0,57
	sensory perception of sound	GO:0007605	0,02	0,02	1,00
	Toll signaling pathway	GO:0008063	0,02	0,02	1,00
	amino acid biosynthetic process	GO:0008652	0,12	0,30	0,40
	phospholipid biosynthetic process	GO:0008654	0,05	0,09	0,56
	aerobic respiration	GO:0009060	0,34	1,68	0,20
	glutamine family amino acid metabolic process	GO:0009064	0,09	0,14	0,64
	aromatic amino acid family biosynthetic process	GO:0009073	0,02	0,05	0,40
	histidine family amino acid metabolic process	GO:0009075	0,00	0,02	0,00
	coenzyme catabolic process	GO:0009109	0,09	0,14	0,64
	ribonucleoside metabolic process	GO:0009119	0,05	0,07	0,71
	nucleoside monophosphate biosynthetic process	GO:0009124	0,05	0,11	0,45
	oligosaccharide biosynthetic process	GO:0009312	0,00	0,05	0,00
	response to gamma radiation	GO:0010332	0,00	0,05	0,00
	synaptic vesicle budding	GO:0016185	0,00	0,05	0,00
	benzoate metabolic process	GO:0018874	0,05	0,07	0,71
	hexose metabolic process	GO:0019318	0,21	0,28	0,75
	pyridine nucleotide metabolic process	GO:0019362	0,05	0,09	0,56
	T cell differentiation	GO:0030217	0,00	0,05	0,00
	chromosome condensation	GO:0030261	0,02	0,07	0,29
	apoptotic nuclear changes	GO:0030262	0,04	0,07	0,57
	regulation of protein stability	GO:0031647	0,02	0,09	0,22

tetrapyrrole biosynthetic process	GO:0033014	0,05	0,07	0,71
eye photoreceptor cell development	GO:0042462	0,02	0,02	1,00
organelle ATP synthesis coupled electron transport	GO:0042775	3,04	5,36	0,57
positive regulation of apoptosis	GO:0043065	0,11	0,18	0,61
biopolymer methylation	GO:0043414	0,09	0,14	0,64
regulation of kinase activity	GO:0043549	0,18	0,28	0,64
cellular protein complex assembly	GO:0043623	0,05	0,21	0,24
dicarboxylic acid metabolic process	GO:0043648	0,04	0,16	0,25
cellular carbohydrate catabolic process	GO:0044275	0,16	0,23	0,70
indolalkylamine biosynthetic process	GO:0046219	0,02	0,05	0,40
monosaccharide catabolic process	GO:0046365	0,11	0,23	0,48
acylglycerol biosynthetic process	GO:0046463	0,00	0,07	0,00
retinal cell programmed cell death	GO:0046666	0,02	0,02	1,00
regulation of compound eye retinal cell programmed cell death	GO:0046669	0,02	0,02	1,00
negative regulation of retinal cell programmed cell death	GO:0046671	0,02	0,02	1,00
lipid phosphorylation	GO:0046834	0,00	0,09	0,00
positive regulation of lipid biosynthetic process	GO:0046889	0,02	0,02	1,00
synaptic vesicle endocytosis	GO:0048488	0,02	0,05	0,40
positive regulation of transferase activity	GO:0051347	0,04	0,05	0,80
negative regulation of transferase activity	GO:0051348	0,00	0,02	0,00
oocyte nucleus localization during oocyte axis determination	GO:0051663	0,02	0,02	1,00

Library	Number of immune unigenes	BLAST identification	EST accession number
SSH-C	31	Serine protease	FQ893761
		Serine protease	FQ893667
		Serine protease	FQ893623
		Serine protease	FQ893394
		Serine protease	FQ893914
		Serpin	FQ893681
		Serpin	FQ893573
		Serpin	FQ893895
		Serpin	FQ893888
		alpha-2 macroglobilin	FQ893810
		alpha-2 macroglobilin	FQ893384
		alpha-2 macroglobilin	FQ893750
		SOD	FQ893491
		SOD	FQ893604
		Thioredoxin	FQ893739
		Thioredoxin	FQ893583
		Ferritin	FQ893815
		Ovoperoxidase	FQ893638
		Salivary peroxidase	FQ893265
		Hemolymph proteinase	FQ893669
		Hemocyanin	FQ893601
		Masquerade	FQ893563
		Masquerade	FQ893636
		Cathepsin	FQ893968
		Cathepsin	FQ893917
		Cathepsin	FQ893627
		Coagulation	FQ893366
		Coagulation	FQ893759
		Transglutaminase	FQ893748
		Catalase	FQ893488
		Catalase	FQ893510
		ALF	FQ893962
SSH-NC	29	Cniwi	FQ894315
		Kallikrein	FQ894504
		Cathepsin	FQ894158
		Cathepsin	FQ894300
		Cathepsin	FQ894626
		Cathepsin	FQ894347
		Cathepsin	FQ894150
		Cathepsin	FQ894548
		Cathepsin	FQ894418
		Cathepsin	FQ894512
		Cathepsin	FQ894234
		Cathepsin	FQ894583
		Cathepsin	FQ894379
		Cathepsin	FQ894370
		Cathepsin	FQ894326
		Cathepsin	FQ894229
		Cathepsin	FQ894083
		Cathepsin	FQ894021
		Cathepsin	FQ893994
		Cathepsin	FQ893988
		Hemocyanin	FQ894523
		Hemocyanin	FQ894494
		Hemocyanin	FQ894164
		Hemocyanin	FQ894087
		Hemocyanin	FQ894168

		Hemocyanin	FQ894161
		Hemocyanin	FQ893990
		14-3-3 protein	FQ894275
		ppaF	FQ891505
SSH-S	1	Serine protease	FQ892721
SSH-A	6	Vasa	FQ892823
		C-type lectin	FQ892973
		Thioredoxin	FQ893083
		Thioredoxin	FQ893118
		ppaF	FQ892839
		Kallikrein	FQ893020
OS	15	Serine protease	FQ887028
		Serine protease	FQ885101
		Glutathione peroxidase	FQ887758
		Glutathione peroxidase	FQ886901
		Thioredoxin peroxidase	FQ884946
		Thioredoxin	FQ887737
		SOD	FQ887525
		alpha-2 macroglobilin	FQ885631
		Lectin	FQ887089
		Lectin	FQ885351
		Ferritin	FQ887056
		Kallikrein	FQ886276
		ppaF	FQ886787
		Vasa	FQ885102
		Calreticulin	FQ885078
OA	21	Serine protease	FQ890866
		Ferritin	FQ889498
		Thioredoxin	FQ891067
		Thioredoxin	FQ888463
		Thioredoxin	FQ889351
		Thioredoxin peroxidase	FQ889661
		Masquerade	FQ887977
		Cathepsin	FQ891314
		Cathepsin	FQ888267
		Cathepsin	FQ889870
		Lectin	FQ888287
		Lectin	FQ888908
		Runt	FQ891956
		Kallikrein	FQ890153
		Kallikrein	FQ890190
		Autophagy protein	FQ888699
		Vasa	FQ889550
		Piwi	FQ889702
		Ferritin	FQ889704
		Calreticulin	FQ889703
		Bip2	FQ892076



RÉSUMÉ

La symbiose constitue une force évolutive majeure permettant de nombreuses adaptations des partenaires, en particulier dans la réponse des hôtes aux agents pathogènes. La bactérie endosymbiotique *Wolbachia* (α -protéobactérie) confère ainsi à certains insectes une résistance aux agents pathogènes humains dont ils sont les vecteurs. Chez le crustacé isopode *Armadillidium vulgare*, la présence de *Wolbachia* altère l'immunocompétence de son hôte en diminuant le taux d'hémocytes circulants (THC) et en augmentant la septicémie naturelle. La présence de *Wolbachia* dans les hémocytes et les organes hématopoïétiques a soulevé de nombreuses questions quant aux conséquences que cela entraîne sur le fonctionnement du système immunitaire et sur l'immunocompétence d'*A. vulgare*.

Nous avons donc étudié l'impact de cette symbiose sur les hémocytes, l'immunocompétence et l'expression de gènes de l'immunité. Ainsi *Wolbachia* est présente dans plus d'un tiers des hémocytes (hybridation *in situ* fluorescente) et sa présence diminue la proportion d'hémocytes granulaires circulants (cytométrie en flux) chez les animaux âgés d'un an, sans affecter le THC à cet âge. L'activité phénoloxydase diminue avec l'âge et le statut symbiotique. En revanche, la présence de *Wolbachia* semble protéger les hémocytes de l'apoptose et augmenter l'immunocompétence d'*A. vulgare* lors d'une infection par *Listeria ivanovii*. Enfin, la quantification de l'expression des gènes de l'immunité, identifié après l'établissement du premier transcriptome de référence d'isopode (projet ANR EndoSymbArt), a révélé une tendance à la sous-expression au niveau de l'animal entier et des ovaires mais à la sur-expression dans les tissus immunitaires.

La présence de *Wolbachia* modifie donc les caractéristiques du système immunitaire aux niveaux cellulaire et humoral ainsi que l'immunocompétence d'*A. vulgare*. L'étude de nouveaux paramètres permettra d'établir si la présence de *Wolbachia* constitue réellement un avantage pour son hôte ou si au contraire la bactérie présente un coût parasitaire important.

MOTS-CLÉS

Armadillidium vulgare, *Wolbachia*, immunité, hémocytes, organes hématopoïétiques, activité PO, taux d'hémocytes circulants, cytométrie en flux, RT-qPCR

TITLE

***Wolbachia* (α -proteobacteria) symbiosis: impacts on the immune system and the immunocompetence of its host *Armadillidium vulgare* (crustacean isopod)**

ABSTRACT

Symbiosis represents a major evolutionary force leading to many adaptations of the partners, especially in response to pathogens. The endosymbiotic bacteria *Wolbachia* (α -proteobacteria) confer resistance to pathogens for vector insects. In the isopod crustacean *Armadillidium vulgare*, *Wolbachia* modify the host immunocompetence by decreasing total hemocyte count (THC) and increasing the natural septicemia. The presence of the bacteria in hemocytes and hematopoietic organs raises many questions about consequences of this presence on immune system functions and on immunocompetence of *A. vulgare*.

We thus studied the impact of the symbiosis on hemocytes, immunocompetence and immune gene expressions. We showed by fluorescent *in situ* hybridization that *Wolbachia* infect more than one third of the hemocytes and by flow cytometry that the proportion of circulating granular hemocytes is lower in one-year old infected animals, without any difference in THC at this age. Phenoloxidase activity decreases with age and symbiotic status. However, the *Wolbachia* presence seems to protect hemocytes against apoptosis and to increase host immunocompetence during infection with *Listeria ivanovii*. Finally, the quantification of the expression of immune genes, identified after establishing the first reference transcriptome of isopods (ANR EndoSymbArt project), revealed a trend to under-expression in whole animal and ovaries but an over-expression in immune tissues.

Therefore, the *Wolbachia* presence modifies immune system characteristics at cellular and humoral levels and the immunocompetence of *A. vulgare*. The study of new parameters will clarify if the *Wolbachia* presence is a real benefit to its host or if the bacteria do have a significant cost to its host.

KEYWORDS

Armadillidium vulgare, *Wolbachia*, immunity, hemocytes, hematopoietic organs, PO activity, total hemocytes count, flow cytometry, RT-qPCR
